

Andrea Granada Ferreira

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
DE β CICLODEXTRINA-*b*-POLI(ϵ -CAPROLACTONA) E
MALTOHEPTAOSE₇-*b*-POLI(ϵ -CAPROLACTONA) VISANDO A
INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva

Coorientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis
2015

Este trabalho é dedicado ao pequeno José que adentrou minha vida com seus oito anos.

“Oh! Que saudades que tenho da aurora da minha vida

Da minha infância querida que os anos não trazem mais.”

Meus oito anos (Casimiro de Abreu).

AGRADECIMENTOS

Aos meus companheiros de alma, pelos reencontros;

À minha família terrena, pelos desafios e crescimento pessoal;

Aos meus sobrinhos, Breno, Cauan e Yasmin, pelo amor incondicional;

Ao Prof. Marcos Segatto, pela oportunidade e confiança no meu trabalho;

Ao Prof. Valdir Soldi, pela amizade, aprendizados, oportunidade, confiança e exemplo pessoal;

Ao diretor do CERMAV Redouane Borsali, pela oportunidade de realizar parte deste trabalho em Grenoble (França);

Ao pesquisador do CERMAV Issei Otsuka, pela síntese dos copolímeros e orientações no desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados;

À Prof^{ra}. Silvia Cuffini, pela amizade, ensinamentos e colaborações nas etapas finais deste trabalho;

À amiga Gabriela Rauber, pela amizade, compreensão e apoio profissional e pessoal;

Aos amigos de alma Fabio Hasegawa, Filipe Kuster, Débora Cardoso e Samantha Lopes por fazerem parte de minha vida antes, durante e depois desta etapa;

À Myrtes, pelas orientações com paciência, competência e luz na minha jornada espiritual;

Às amigas Monika Tagliari, Gislaine Kuminek e Samira Fayad pelos momentos agradáveis durante os desafios no laboratório;

Ao amigo e colaborador especial Thiago Caon, pela competência, paciência, disposição e nobreza de caráter;

A todos os professores, servidores e colegas de trabalho do Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC e do CERMAV que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho;

Aos órgãos de fomento, CAPES e Programa CAPES-COFECUB, pelo auxílio financeiro no Brasil e na França, respectivamente;

À UFSC, PGFAR, UJF e CERMAV.

♪ And now the end is near
And so I face the final curtain.
And more, much more than this.
I did it my way.
Regrets, I've had a few.
But then again, too few to mention.
I did what I had to do
And saw it through without exemption.
I've planned each charted course.
Each careful step along the by way.
And more, much more than this.
I did it my way ♪
(Frank Sinatra)

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados obtidos a partir da autoassociação de copolímeros anfifílicos em bloco para liberação controlada de fármacos por via tópica. Dois diferentes sistemas de vesículas poliméricas (VPs) foram desenvolvidos pela técnica de inversão da microfase em água: as VPs de β ciclodextrina-*bloco*-poli(ϵ -caprolactona)_{5k} (β CD-*b*-PCL_{5k}), e as VPs de maltoheptaose-*bloco*-poli(ϵ -caprolactona)_{5k} (Mal₇-*b*-PCL_{5k}). As suspensões obtidas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, teor de fármaco e morfologia. Ambos os sistemas coloidais apresentaram forma esférica com uma estreita faixa de distribuição de tamanho de partícula e alta capacidade de incorporação dos fármacos: progesterona e propionato de clobetasol. Estudos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS) mostraram raios hidrodinâmicos (R_H) em torno de 72 nm para as VPs de β CD-*b*-PCL_{5k}, e de 34 nm para as VPs de Mal₇-*b*-PCL_{5k} e raio de giro (R_g) de 66 nm para as VPs de β CD-*b*-PCL_{5k}, e de 40 nm para as VPs de Mal₇-*b*-PCL_{5k}. A morfologia das VPs foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e estimada a partir de uma relação entre o R_H com o raio de giração (R_g), ρ -ratio. Os valores de ρ -ratio para ambos os sistemas foram próximos de 1, indicando que estes sistemas nanoestruturados tendem a formar vesículas em meio aquoso. As suspensões de VPs contendo progesterona e as suspensões de VPs contendo propionato de clobetasol apresentaram valores de eficiência de encapsulação próximos a 100 %, e potencial zeta negativo para ambos os sistemas de copolímeros. A incorporação de fármacos a partir da autoassociação de copolímeros anfifílicos em bloco em meio aquoso indicou a formação de cristais de fármaco durante o preparo destas VPs. Os sistemas β CD-*b*-PCL_{5k} e Mal₇-*b*-PCL_{5k} contendo progesterona foram selecionados para estudos de cristalização de fármacos, sendo confirmada a presença de cristais de progesterona pela técnica de difração de raios X de pó (XRPD). Estudos de permeação cutânea foram realizados com o intuito de avaliar a permeação da progesterona por via tópica bem como a influência dos cristais de progesterona na permeabilidade. Foi observada uma redução na permeabilidade da progesterona influenciada pela presença de cristais de progesterona dentro dos sistemas vesiculares. Desta forma, os sistemas nanoestruturados de β CD-*b*-PCL_{5k} e Mal₇-*b*-PCL_{5k} contendo

progesterona apresentam-se como um sistema modelo promissor para estudar a cristalização polimórfica de fármacos a partir de técnicas de preparo de VPs e avaliar sua influência em tais sistemas nanoestruturados.

Palavras-chave: vesículas poliméricas, copolímeros anfifílicos, caracterização físico-química, permeação cutânea.

ABSTRACT

This study describes the development of nanostructured systems based on the self-assembly amphiphilic block copolymers (BCPs) aiming a topical drug delivery. β -cyclodextrin-*block*-poly(ϵ -caprolactone)_{5k} (β CyD-*b*-PCL_{5k}) polymeric vesicles (VPs) and maltoheptaose-*block*-poly(ϵ -caprolactone)_{5k} (Mal₇-*b*-PCL_{5k}) VPs were developed by microphase inversion method and characterized according to the particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, drug content and morphology. Both colloidal systems displayed spherical shape and monodisperse distribution of particles and showed high drug loading efficiency, confirming its suitability as delivery system for lipophilic drugs (progesterone and clobetasol propionate were considered as drug model). Dynamic light scattering (DLS) studies showed hydrodynamic radius (R_H) of 72 nm for β CyD-*b*-PCL_{5k} VPs, and 34 nm for Mal₇-*b*-PCL_{5k} VPs. Static light scattering (SLS) studies showed the radius of gyration (R_g) of 66 nm for β CyD-*b*-PCL_{5k} VPs, and 40 nm for Mal₇-*b*-PCL_{5k} VPs. The morphology of the VPs was monitored by transmission electron microscopy (TEM) and estimated from a relationship between R_H and R_g , p -ratio. The p -ratio values of both nanoparticle systems were close to 1, indicating that both types of amphiphilic BCPs are able to form vesicular particles in water. Progesterone-loaded and clobetasol propionate-loaded VPs exhibited encapsulation efficiency values close to 100 %, and all VPs were negatively charged. The incorporation of drugs by self-assembly of amphiphilic BCPs may lead to formation of drug crystals during preparation, and thus crystallization studies were performed using X-ray powder diffraction and microscopical techniques. Skin permeation studies were also carried out in order to evaluate the influence of progesterone crystals on the skin permeation. The drug crystallization in the nanostructured systems resulted in a reduction of progesterone permeation through skin. Nanostructured systems based on β CyD-*b*-PCL_{5k} e Mal₇-*b*-PCL_{5k} with progesterone can be selected as a model system to study the polymorphic crystallization of drugs from VPs preparation techniques and also to control drug release.

Keywords: polymeric vesicles, amphiphilic block copolymers, physical-chemical characterization, skin permeation.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	Revisão da Literatura	
Figura 1	Nanoestruturas obtidas a partir da autoassociação de copolímero anfifílico em bloco em solução aquosa: (a) membranas poliméricas (b) micelas cilíndricas e (c) micelas esféricas.....	37
Figura 2	Formação de diferentes morfologias a partir de um copolímero em bloco em solução: (a) micelas esféricas, (b) micelas cilíndricas e (c) vesículas.....	38
Figura 3	Formação de nanoestruturas do tipo micelas (a) “starlike” e (b) “crew-cut” em meio aquoso.....	38
Figura 4	Formação de nanoestruturas do tipo micelas (a) esféricas (b) inversa e (c) vesículas em meio aquoso.....	39
Figura 5	Representação de uma vesícula polimérica desenvolvida a partir de PS- <i>b</i> -PAA decorada com quitosana contendo finasterida.....	41
Figura 6	Estrutura química da (a) ϵ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$ e (b) Estrutura da poli(ϵ -caprolactona) representada pela sua unidade monomérica, a ϵ -caprolactona, com o anel aberto.....	42
Figura 7	Estrutura química do oligossacarídeo Maltoheptaose.....	43
Figura 8	Estrutura química do oligossacarídeo β ciclodextrina.....	45
Figura 9	Figura esquemática da síntese do copolímero em bloco Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k}	47
Figura 10	Figura esquemática da síntese do copolímero em bloco β CD- <i>b</i> -PCL _{5k}	47
Figura 11	Estrutura química da (a) progesterona e do (b) propionato de clobetasol.....	53
Figura 12	Rotas de penetração de VPs através do estrato córneo.....	58

Capítulo 2 Novel hybrid block copolymer nanocarrier systems to load lipophilic drugs prepared by microphase inversion method

Figura 1	Representação esquemática de preparação de VPs contendo fármaco pela técnica de inversão da microfase em água.....	78
Scheme 1	Synthesis of β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k}	89
Fig. 1.	SEC traces of PCL _{5k} -N ₃ (dotted line), and β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} (solid line).....	89
Fig. 2.	¹ H NMR spectrum of β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} in DMF-d ₇	90
Fig. 3.	Correlation functions and decay time distribution obtained at the scattering angle 90° for (a) β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} and (b) Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} aqueous suspension	91
Fig. 4.	Variation of the relaxation frequency (Γ) vs the square of the (q^2) wave vector of (a) β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} and (b) Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} aqueous suspension...	92
Fig. 5.	Guinier plots calculated from the elastic light scattering intensity of (a) β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} and (b) Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} aqueous suspension.....	93
Fig. 6.	TEM images of (a) unloaded- β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} VPs and (b) unloaded-Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} VPs.....	94
Fig. 7.	Autocorrelation functions and decay time distributions measured at scattering angle 90°, as revealed by Contin analysis plot, for (a) Clobetasol propionate-loaded- β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} VPs, (b) Progesterone-loaded- β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} VPs, (c) Clobetasol propionate-loaded-Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} VPs and (d) Progesterone-loaded- Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} VPs...	96
Fig. 8.	Chemical structure of (a) Progesterone and (b) Propionate clobetasol.....	96

Capítulo 3 Improved quantification of the drug-loaded nanoparticles by applying static light scattering prior to HPLC analysis

Fig. 1.	Representative chromatograms obtained in validation studies: (A) unloaded- β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} VPs, (B) unloaded-Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} VPs and (C) progesterone at 25 μ g mL ⁻¹ in solution of acetone and water	115
----------------	---	------------

Fig. 2.	Representative chromatograms obtained in validation studies: (A) unloaded- β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} VPs, (B) unloaded-Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} VPs and (C) clobetasol propionate at 25 μ g mL ⁻¹ in solution of acetone and water.....	116
Fig. 3.	SLS of β CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} copolymer/solvents system [acetone:water].....	117
Fig. 4.	SLS of Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} copolymer/solvents system [acetone:water].....	117
Capítulo 4	Presença de cristais de progesterona nas vesículas poliméricas e sua relação na permeação cutânea	
Figura 1	Micrografia de MET para as vesículas contendo progesterona do copolímero (a) β CD- <i>b</i> -PCL _{5k} e (c) Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} ; micrografia de cryo-MET em alta magnificação para as vesículas contendo progesterona do copolímero (b) β CD- <i>b</i> -PCL _{5k} (d) Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k}	133
Figura 2	Difratogramas referentes às formas polimórficas da progesterona, as vesículas com base em Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} contendo progesterona, as vesículas com base em Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} sem fármaco e o copolímero em pó.....	134
Figura 3	Espectros Raman referentes às formas polimórficas da progesterona, as vesículas com base em β CD- <i>b</i> -PCL _{5k} contendo progesterona, as vesículas com base em β CD- <i>b</i> -PCL _{5k} sem fármaco e o copolímero em pó.....	135
Figura 4	Difratogramas referentes às formas polimórficas da progesterona, as vesículas com base em β CD- <i>b</i> -PCL _{5k} contendo progesterona, as vesículas com base em β CD- <i>b</i> -PCL _{5k} sem fármaco e o copolímero em pó.....	136
Figura 5	Espectros Raman referentes às formas polimórficas da progesterona, as vesículas com base em Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} contendo progesterona, as vesículas com base em Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} sem fármaco	

	e o copolímero em pó.....	137
Figura 6	Fotomicrografias obtidas por MEV referentes aos cristais de progesterona obtidos a partir de vesículas com base em β CD- <i>b</i> -PCL _{5k}	138
Figura 7	Fotomicrografias obtidas por MEV referentes aos cristais de progesterona obtidos a partir de VPs com base em Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k}	139
Figura 8	Perfil de permeação da progesterona através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações.....	141
Figura 9	Retenção cutânea (estrato córneo+derme+epiderme) de diferentes preparações da progesterona.	149

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 Revisão da Literatura

Tabela 11	Características físico-químicas da progesterona e do propionato de clobetasol.....	55
-----------	--	-----------

Capítulo 2 Novel hybrid block copolymer nanocarrier systems to load lipophilic drugs prepared by microphase inversion method

Tabela 1	Drug content, entrapment efficiency and zeta potential of VPs	97
----------	---	-----------

Capítulo 3 Novel hybrid block copolymer nanocarrier systems to load lipophilic drugs prepared by microphase inversion method

Table 1	Drug content and entrapment efficiency of VPs.....	115
---------	--	------------

Capítulo 4 Presença de cristais de progesterona nas vesículas poliméricas e sua relação na permeação cutânea

Tabela 1	Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor de progesterona ($\mu\text{g/mL}$), diâmetro médio de partícula (nm) e pontecial zeta (mV) das VPs contendo progesterona.....	140
----------	---	------------

Tabela 2	Retenção cutânea (estrato córneo+derme+epiderme) de diferentes preparações da progesterona.....	141
----------	---	------------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> ; Análise de Variância
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Center
CLAE	<i>High Performance Liquide Chromatography (HPLC)</i> ; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CuBr	<i>Copper bromide</i> ; Brometo de Cobre
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> ; Espalhamento de Luz Dinâmico
DRXP	Difração de raio-X de pó
¹ H NMR	<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i> ; Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
LOD	<i>Limit of detection</i> ; Limite de Detecção
LOQ	Quantitation Limit, Limite de Quantificação
Mw	Molecular weight; Massa molecular
PMDETA	<i>N,N,N',N',N''-Pentamethyldiethylenetriamine</i> ; N,N,N',N'',N'''-Pentametil Dietilenotriamina
SLS	<i>Static Light Scattering</i> ; Espalhamento de Luz Estático
R _H	<i>Hydrodynamic Radius</i> ; Raio Hidrodinâmico
R _g	<i>Radius of gyration</i> ; Raio de giro

RPM	Rotações por Minuto
MET	<i>Transmission Electron Microscopy</i> ; Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
THF	<i>Tetrahydrofuran</i> ; Tetrahidrofurano

LISTA DE SIMBOLOS

D	Diffusion Coefficient; Coeficiente de Difusão
I	Scattering Intensity; Intensidade de Luz Espalhada
Γ	Frequência de relaxação
q	Scattering Vector; Vetor de Espalhamento
S	Slope of the Calibration Curve; Inclinação da Curva de Calibração
T	Temperature; Temperatura
t	Time; Tempo
ζ	Zeta Potential; Potencial Zeta
η	Viscosity; Viscosidade
θ	Scattering Angle; Ângulo de Espalhamento
κ_B	Boltzmann Constant; Constante de Boltzmann
λ	Light Wavelength; Comprimento de Onda
σ	Standard Deviation of y-Intercepts of Regression Lines; Desvio Padrão dos Interceptos das Curvas de Calibração com o Eixo Y
τ	Decay Time; Tempo de decaimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	29
1.1	OBJETIVOS.....	31
1.1.1	Objetivo geral.....	31
1.1.2	Objetivos específicos.....	31

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

1	INTRODUÇÃO.....	35
1.1	COPOLÍMEROS EM BLOCO.....	35
1.1.1	Poli(ϵ -caprolactona).....	41
1.1.2	Maltoheptose ₇ - <i>bloco</i> -Poli(ϵ -caprolactona) _{5k}	43
1.1.3	β Ciclodextrina- <i>bloco</i> -Poli(ϵ -caprolactona) _{5k}	44
1.1.4	“Click Chemistry”.....	46
1.2	VESÍCULAS POLIMÉRICAS VISANDO USO TÓPICO.....	48
1.2.1	Caracterização físico-química de vesículas poliméricas.....	49
1.2.1.1	Espalhamento de luz dinâmico e estático.....	49
1.2.1.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	51
1.2.1.3	Potencial zeta.....	51
1.2.2	Incorporação de fármacos nas vesículas poliméricas.....	52
1.2.2.1	Fármacos modelos: progesterona e propionato de clobetasol.....	53
1.2.3	Permeação cutânea.....	55
1.2.3.1	Rotas de permeação cutânea.....	57
2	REFERÊNCIAS.....	59

CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1 - NOVEL HYBRID BLOCK COPOLYMER NANOCARRIER SYSTEMS TO LOAD LIPOPHILIC DRUGS PREPARED BY MICROPHASE INVERSION METHOD

1	INTRODUCTION.....	83
2	MATERIALS AND METHODS.....	84
2.1	Materials.....	84
2.2	Synthesis of β Cyd- <i>b</i> -PCL _{5k}	85
2.2.1	Intruments.....	85

2.3	Preparation of drug-loaded polymeric vesicles	83
2.4	Zeta potential measurements.....	84
2.5	Dynamic (DLS) and Static (SLS) light scattering.....	84
2.6	Transmission Eletron Microscopy (TEM).....	85
2.7	Encapsulation Efficiency (EE).....	85
2.8	HPLC analysis.....	83
2.9	Statical analysis.....	84
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	84
4	CONCLUSION.....	85
5	REFERENCES.....	85

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2 - IMPROVED QUANTIFICATION OF THE DRUG-LOADED NANOPARTICLES BY APPLYING STATIC LIGHT SCATTERING PRIOR TO HPLC ANALYSIS

1	INTRODUCTION.....	111
2	MATERIALS AND METHODS.....	112
2.1	Materials.....	112
2.2	Preparation of copolymer samples.....	112
2.3	Preparation of VPs.....	112
2.4	Static light scattering (SLS).....	113
2.5	Reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC).....	113
2.6	Drug entrapment efficiency.....	113
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	114
4	CONCLUSION.....	119
5	REFERENCES.....	121

CAPÍTULO 4 - PRESENÇA DE CRISTAIS DE PROGESTERONA NAS VESÍCULAS POLÍMICAS E SUA RELAÇÃO NA PERMEACÃO CUTÂNEA

1	INTRODUÇÃO.....	125
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	127
2.1	Materiais.....	127
2.2	Preparações das VPs.....	127
2.3	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-MET).....	127
2.4	Difração de raios X de pó (DRXP).....	128

2.5	Espectroscopias vibracionais Raman.....	128
2.6	Microscopia Eletrônica de Varreruda (MEV)..	129
2.7	Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da progesterona nas VPs	129
2.8	Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta.....	130
2.9	Avaliação da permeação cutânea das VPs contendo progesterona.....	130
2.10	Análise estatística.....	131
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
4	CONCLUSÕES.....	143
5	REFERÊNCIAS.....	145
CONCLUSÃO GERAL.....		151
REFERÊNCIAS.....		153

1 INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento da nanotecnologia tem se expandido rapidamente nos últimos anos proporcionando um alto impacto nas áreas científicas e tecnológicas (LI et al., 2011). Na área de desenvolvimento farmacêutico a nanotecnologia se destaca pelo aprimoramento e desenvolvimento de novos sistemas carreadores de fármacos com capacidade de incorporação, transporte e liberação de forma controlada e vetorizada destes ativos (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2007).

Diversos tipos de sistemas nanoestruturados compostos de uma grande variedade de biomateriais têm sido desenvolvidos na última década, em particular, destacam-se a importância dos copolímeros anfifílicos em bloco biodegradáveis que, por sua vez, apresentam segmentos hidrofílico e hidrofóbico capazes de se autoassociar em solvente seletivo formando micelas, vesículas ou nanopartículas. Em solução, as interações entre o solvente e os diferentes blocos proporcionam a capacidade de formar nanoestruturas bem definidas aumentando a variedade de aplicações destes sistemas (SMART et al., 2008). Dentre os sistemas nanoestruturados desenvolvidos por diferentes biomateriais podem-se destacar as nanoesferas (SHEN et al., 2011), as nanocápsulas (GRANADA et al., 2008; GRANADA et al., 2013; NORONHA et al., 2013), os lipossomas (ZAMBONI, 2005; RUOZI et al., 2007; BRIONES; COLINO; LANA, 2008), os dendrímeros (GUPTA et al., 2006; AGARWAL et al., 2008), os cristais líquidos (MÜLLER-GOYMANN, 2004; SAULNIER et al., 2008) e as micelas e vesículas poliméricas (VPs) (JONES; LEROUX, 1999; CAON et al., 2014).

Este trabalho de tese foi desenvolvido a partir de uma colaboração financiada pelo Programa Capes-Cofecub (Projeto 620/08) entre os laboratórios brasileiro, Controle de Qualidade e Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (UFSC), e um centro de pesquisa de alta tecnologia em polímeros naturais, *Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales* (CERMAV-CNRS), associado à Universidade de Grenoble (França). O *Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales* (CERMAV) atua principalmente na síntese e caracterização de copolímeros em bloco, sendo que para este trabalho foi sintetizado copolímeros híbridos em bloco constituídos por um bloco

natural, a partir de oligossacarídeos, e um bloco polimérico sintético biodegradável, com capacidade de se autoassociar em solvente seletivo, para desenvolvimento de sistemas nanoestruturados promissores na liberação de fármacos para uso tópico. Dentro deste contexto as VPs desenvolvidas a partir destes copolímeros híbridos em bloco β ciclodextrina-*bloco*-poli(ϵ -caprolactona) (β CD-*b*-PCL_{5k}) e maltoheptaose₇-*bloco*-poli(ϵ -caprolactona) (Mal₇-*b*-PCL_{5k}) foram testadas quanto a sua capacidade de incorporar dois fármacos modelos, progesterona e propionato de clobetasol, sendo que as VPs contendo progesterona foram avaliadas quanto a formação de cristais de fármacos dentro dos sistemas nanoestruturados e sua influência na permeação cutânea.

A apresentação deste trabalho está disposta na forma de capítulos, sendo a revisão da literatura apresentada no capítulo 1, o desenvolvimento e caracterização físico-química das VPs, em forma de artigo, no capítulo 2; o emprego de espalhamento de luz no desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos nas vesículas poliméricas, em forma de artigo, no capítulo 3; a relação entre o estudo de permeação cutânea e a presença de cristais de progesterona formados dentro das VPs no capítulo 4 e, finalmente, a conclusão geral em função de todos os resultados obtidos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados a partir da autoassociação de copolímeros originais híbridos em bloco (natural-*b*-sintético) com vistas à incorporação dos fármacos modelos, progesterona e propionato de clobetasol.

1.1.2 Objetivos específicos

Desenvolver VPs a partir da autoassociação dos copolímeros híbridos em bloco sintetizados: β ciclodextrina-*bloco*-poli(ϵ -caprolactona)_{5k} (β CD-*b*-PCL_{5k}) e maltoheptaose₇-*bloco*-poli(ϵ -caprolactona)_{5k} (Mal₇-*b*-PCL_{5k});

Caracterizar as VPs através das técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta;

Analisar a morfologia das VPs empregando as técnicas de DLS, espalhamento de luz estático (SLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-MET);

Incorporar em ambos os sistemas vesiculares (β CD-*b*-PCL_{5k} e Mal₇-*b*-PCL_{5k}) dois fármacos modelos, com mecanismos de ação e sítios de vetorização diferentes, progesterona e propionato de clobetasol;

Desenvolver e validar metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar o teor de fármaco incorporado e eficiência de encapsulação das nanopartículas;

Avaliar os sistemas de copolímeros em misturas binárias de solventes por SLS para determinar a melhor proporção dos solventes empregada na quantificação do teor de fármacos nas VPs;

Identificar e caracterizar a formação de cristais de progesterona nas VPs através de difração de raios X de pó (DRXP) e espectroscopia vibracional Raman;

Realizar avaliação *ex vivo* da permeação cutânea das VPs contendo progesterona em pele de orelha suína através do modelo da câmara de difusão de Franz e avaliar a influência dos cristais formados nas VPs na permeabilidade.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 COPOLÍMEROS EM BLOCO

Os copolímeros em bloco são uma classe de macromoléculas compostas por dois ou mais blocos de polímeros (do grego poli = muitos e meros = partes) de natureza química diferentes, unidos por uma ligação covalente em arranjo linear ou ramificado (BATES; FREDRICKSON, 1990; SMART et al., 2008). Estes, por sua vez, tem se destacado em diferentes ramos da nanotecnologia por oferecerem uma vasta gama de possibilidades de arquitetura, tamanho e composição química (BATES; FREDRICKSON, 1990; HAMLEY, 2003). Em particular, os copolímeros anfifílicos em bloco por possuírem em sua estrutura pelo menos duas regiões de natureza distintas, uma hidrofílica e uma hidrofóbica, apresentam a particularidade de se autoassociar, em solução, formando nanoestruturas bem definidas devido à seletividade específica dos blocos em um solvente (LINDMAN; ALEXANDRIDIS, 2000; LINSE, 2000; KATAOKA; HARADA; NAGASAKI, 2001).

O processo de autoassociação é definido como a formação espontânea de estruturas complexas dos componentes do sistema por forças de origem não covalentes, como as forças repulsivas de longo alcance, hidrofílicas e hidrofóbicas, e por forças de atração de curto alcance, como por exemplo, a ligação covalente dos blocos poliméricos e sua incompatibilidade física ou química (BATES; FREDRICKSON, 1990). O grande potencial de muitos destes sistemas está associado ao fato de que uma ligação covalente entre duas ou mais cadeias poliméricas diferentes e incompatíveis limitam sua separação de fases a escalas pré-definidas por suas dimensões moleculares (SMART et al., 2008). Dessa forma, cada bloco residirá sobre sua própria fase enquanto permanece covalentemente ligado a outro, conduzindo à formação de domínios ordenados (FARRELL et al., 2009). O comportamento de auto-organização das cadeias de copolímeros em bloco sob a forma de nanodomínios é governado pela repulsão mútua dos blocos de composição química diferentes, a fim de minimizar a energia livre do sistema (HAMLEY, 2003).

Diferentes teorias foram desenvolvidas para descrever o comportamento dos copolímeros em bloco em solução e os parâmetros que determinam a formação de nanoestruturas definidas. Para os

copolímeros anfifílicos em bloco, em particular, as principais forças contrárias responsáveis pela formação das nanoestruturas em suspensão, a força de atração que tende a unir as moléculas e a força de repulsão que limita o número de moléculas que podem se associar, estão diretamente relacionadas aos diferentes blocos na molécula, hidrofóbico e hidrofílico, sendo que a morfologia resultante será aquela que melhor satisfaça estas exigências a depender do tamanho relativo dos blocos (MYERS, 1992; GUPTA et al., 2006; SMART et al., 2008). Em solução aquosa e em baixas concentrações, os copolímeros apresentam-se como moléculas isoladas. À medida que a concentração aumenta, as interfaces do sistema começam a se saturar e as moléculas de copolímeros orientam-se de tal modo que os blocos hidrofóbicos tendem a ficarem afastados das moléculas de água. Em uma concentração específica, denominada de concentração micelar crítica, os copolímeros anfifílicos em bloco começam a se auto-organizar de modo a separar os blocos insolúveis devido à interação com o solvente (SMART et al., 2008).

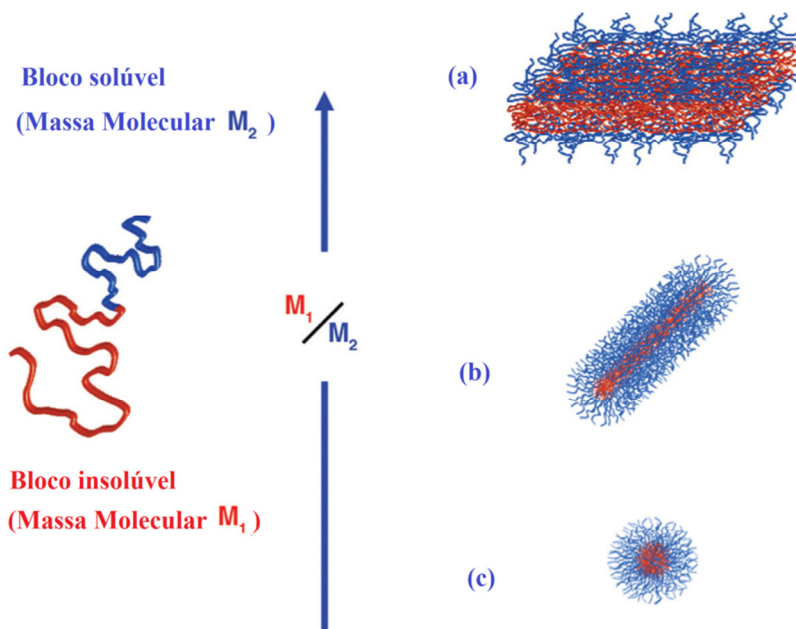
Como regra geral, para copolímeros anfifílicos em água, considera-se o tamanho relativo da região não solúvel de um copolímero (ρ), a área de superfície originada na interface entre os blocos hidrofóbicos e o solvente (a_0) em conjunto com o comprimento do bloco hidrofóbico (d) e o volume do bloco não solúvel (v), equacionados abaixo:

Equação 1

$$\rho = \frac{v}{a_0 d}$$

Dessa forma, conforme demonstrado na Figura 1, as micelas esféricas são formadas quando $\rho \leq \frac{1}{3}$, as micelas cilíndricas são formadas em $\frac{1}{3} < \rho \leq \frac{1}{2}$ e surgem as membranas quando $\frac{1}{2} < \rho \leq 1$ (SOO; EISENBERG, 2004; SMART et al., 2008).

Figura 1: Nanoestruturas obtidas a partir da autoassociação de copolímero anfifílico em bloco em solução aquosa: (a) membranas poliméricas (b) micelas cilíndricas e (c) micelas esféricas.

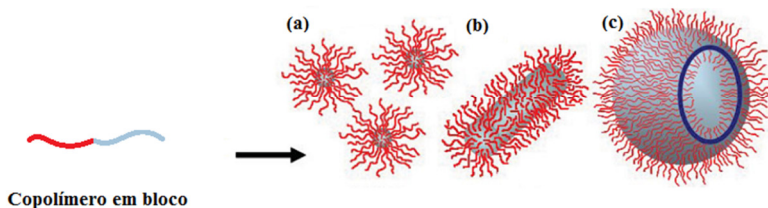


Fonte: Adaptado de SMART et al., (2008).

Diferentes nanoestruturas são definidas principalmente pela proporção entre o bloco hidrofílico e o hidrofóbico, incluindo micelas esféricas, micelas cilíndricas, vesículas poliméricas e outros agregados mais complexos (Figura 2). Outros parâmetros como interação polímero-solvente, concentração inicial, presença de aditivos (HCl, NaOH, sal, etc.) podem interferir na forma e tamanho das nanoestruturas (YU; ZHANG; EISENBERG, 1996), portanto não é possível assumir uma delimitação exata entre a proporção dos blocos e a morfologia. De maneira geral, quando um dos blocos apresenta uma composição de aproximadamente 90% tem-se a formação de estruturas do tipo vesículas (CHOUCAIR; LAVIGUEUR; EISENBERG, 2004; BLANAZS; ARMES; RYAN, 2009; CARLSEN; LECOMMANDOUX,

2009; DU; O'REILLY, 2009) ou micelas do tipo “crew-cut” (YU; ZHANG; EISENBERG, 1996; ZHANG, L.; SHEN; EISENBERG, 1997).

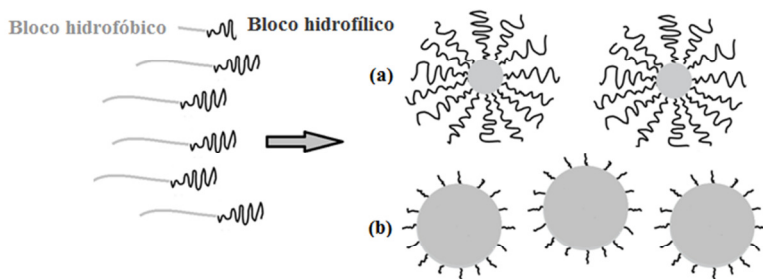
Figura 2: Formação de diferentes morfologias a partir de um copolímero em bloco em solução: (a) micelas esféricas, (b) micelas cilíndricas e (c) vesículas.



Fonte: Adaptado de BLANAZS; ARMES; RYAN, (2009).

É importante diferenciar claramente as características das micelas e VPs a partir da autoassociação de copolímero anfifílico em bloco em meio aquoso. Nas micelas (Figura 3), a princípio, o bloco hidrofóbico forma um núcleo circundado por uma coroa hidrofílica, e dependendo da composição do copolímero em bloco duas estruturas podem ser obtidas: as micelas “starlike”, com um pequeno núcleo em comparação a coroa, e as micelas “crew-cut”, com um grande núcleo e cadeias coronais altamente esticadas (GOHY, 2005; RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005; LETCHFORD; BURT, 2007).

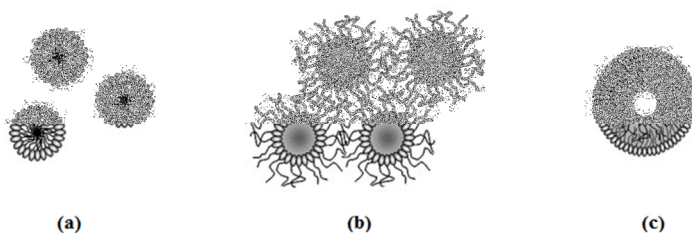
Figura 3. Formação de nanoestruturas do tipo micelas (a) “starlike” e (b) “crew-cut” em meio aquoso.



Fonte: Adaptado de GOHY (2005).

As vesículas ou *polymersomes* (lipossomas à base de polímero) são “bolsas” de tamanho nanométrico com uma bicamada ao redor de um reservatório interno aquoso (Figura 4). Copolímeros em bloco anfifílicos podem formar várias arquiteturas vesiculares em solução, incluindo vesículas uniformes, vesículas polidispersas e vesículas concêntricas ocas (RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005; LETCHFORD; BURT, 2007). Ambos os sistemas, micelas e vesículas por apresentarem pequeno tamanho de partícula e camada externa hidrofílica, quando em meio aquoso externo, podem permanecer por tempo prolongado na circulação sanguínea além da propensão em evitar a opsonização, e consequente captura pelas células do sistema fagocítico (KWON; OKANO, 1996; JONES; LEROUX, 1999; LETCHFORD; BURT, 2007). Estas partículas denominadas furtivas, por sua vez, por permanecer maior tempo na circulação sanguínea se tornam aptas a vetorizar o fármaco incorporado nos sistemas nanoestruturados em sítios de ação específicos (MOGHIMI; HUNTER, 2001; LETCHFORD; BURT, 2007).

Figura 4. Formação de nanoestruturas do tipo micelas (a) esféricas (b) inversa e (c) vesículas em meio aquoso.



Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ et al. (2005).

As VPs, obtidas a partir da autoassociação de copolímeros anfifílicos em água, surgem como potenciais carreadores de fármacos devido à combinação de uma parede espessa hidrofóbica capaz de incorporar princípios ativos pouco solúveis em água e uma cavidade interna aquosa para a encapsulação de agente ativos hidrofílicos

(DISCHER; EISENBERG, 2002; SMART et al., 2008; LEE; FEIJEN, 2012). Os lipossomas, vesículas lipídicas coloidais, são na maioria dos casos provenientes de fosfolipídios com peso molecular bem abaixo de 1 kDa, as VPs, por sua vez, são projetadas a partir de copolímeros em bloco com peso molecular de até 100 kDa o que confere uma membrana mais resistente, menos permeável e menos fluida, além de resultar em maior estabilidade física e química em relações aos lipossomas (BRINKHUIS; RUTJES; HEST, 2011).

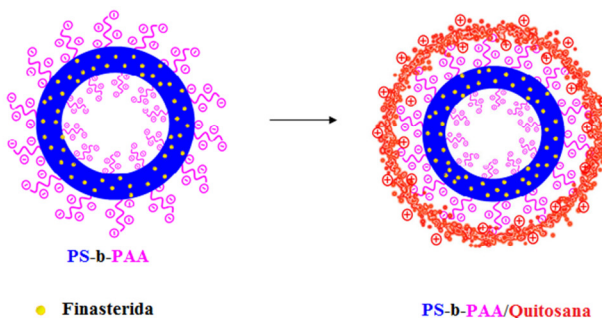
A obtenção de VPs a partir de copolímeros em bloco é favorecida através de duas técnicas principais: cossolvente e reidratação. A técnica de cossolvente, para sistemas de liberação de fármacos, consiste da dissolução do copolímero em um solvente orgânico termodinamicamente bom para os dois blocos, seguida da diluição lenta e progressiva em solvente seletivo para um dos blocos, água ou solução tamponada. Após a formação das vesículas, o solvente orgânico é evaporado por diálise ou pressão reduzida. Na segunda técnica, um filme do copolímero é fundido sobre um substrato e uma solução aquosa é utilizada para hidratar o copolímero formando vesículas (BRINKHUIS; RUTJES; HEST, 2011).

Copolímeros que apresentam um bloco constituído por polissacarídeo possuem propriedades físico-químicas semelhantes aos copolímeros totalmente sintéticos, além de características relevantes para se tornarem sistemas carreadores de fármacos como biodegradabilidade, biocompatibilidade e, em alguns casos, atividade biológica (YADAV; KUMARI; YADAV, 2011). As propriedades e aplicações de copolímeros à base de polissacarídeos também são relacionadas à capacidade de autoassociação, neste caso, principalmente pela presença abundante de grupos hidroxilas ou aminas presentes nos polissacarídeos (BURCHARD, 2001).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm sido relatados na literatura com o emprego de polissacarídeos em sistemas de liberação de fármaco. He, Guo e Zhang (2008) demonstraram o exemplo da quitosana utilizada com sucesso como agente promotor em sistemas de liberação transdérmico, uma vez que esta promoveu uma melhora na permeação transcutânea do hormônio testosterona a partir de diferentes formulações em gel da n-trimetil quitosana *in vitro* e *in vivo*. Caon e colaboradores (2014) avaliaram o efeito de diferentes quitosanas utilizadas na superfície de micelas poliméricas, provenientes do copolímero dibloco poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA), na liberação transdérmica do fármaco finasterida (Figura 5). Neste estudo, a permeação cutânea da finasterida encapsulada em micelas a base de

PS-*b*-PAA revestidas com quitosana foi mais eficiente quando comparada a sistemas não revestidos ou com uma solução hidroalcoólica do fármaco livre, sugerindo que estas micelas decoradas interagem mais fortemente com a superfície da pele devido à carga positiva da quitosana.

Figura 5. Representação de uma vesícula polimérica desenvolvida a partir de PS-*b*-PAA decorada com quitosana contendo finasterida.



Fonte: PORTO (2011).

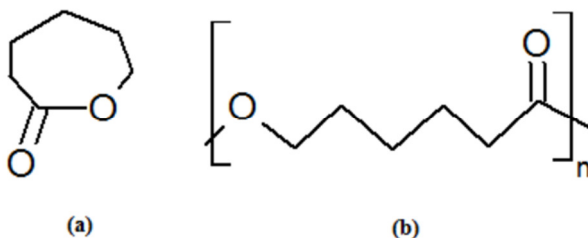
Na literatura encontram-se descritos também copolímeros em bloco autoassociativos com base em polissacarídeos como possíveis sistemas carreadores de fármacos. Liu e Zhang (2007) descreveram a síntese e caracterização de copolímeros constituídos de um bloco hidrofílico composto por segmentos de maltoheptaose ou dextran e o bloco hidrofóbico composto por segmentos de poli (ϵ -caprolactona) capazes de formar micelas esféricas com diâmetros variando de 20 a 50nm, na ausência de solvente orgânico ou surfactante. Houghan e colaboradores (2008) relataram estudos de autoassociação de copolímeros formados por dextran-*b*-poliestireno em diferentes solventes com formação de diferentes morfologias, tais como, vesículas e esferas, dependendo da composição química do bloco do copolímero.

1.1.1 Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL, Figura 6) é um biopolíester pertencente a uma importante classe de polímeros biodegradáveis

formados a partir da abertura do anel do monômero ϵ -caprolactona seguido por polimerização (SOZER; KOKINI, 2009). A PCL é um polímero com baixa temperatura de fusão (55 a 60°C), caráter hidrofóbico e semi-cristalino (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Figura 6: Estrutura química da (a) ϵ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$. (b) Estrutura da poli(ϵ -caprolactona) representada pela sua unidade monomérica, a ϵ -caprolactona, com o anel aberto



Fonte: Adaptado de NAIR; LAURENCIN, (2007).

A PCL sofre degradação microbiana e enzimática devido à hidrólise das suas ligações ésteres, principalmente em condições fisiológicas e, portanto, tem recebido grande atenção para uso na liberação de compostos ativos. Além disso, seu uso é particularmente interessante para o preparo de dispositivos de liberação controlada devido a sua degradação mais lenta e maior estabilidade em relação aos poliácidoaláticos (KUMARI; YADAV; YADAV; CHANDRA; RUSTGI, 1998). Granada e colaboradores (2008) desenvolveram nanocápsulas a partir de PCL com diferentes finalidades, tais como, invólucro para incorporação de agente antitumoral, a camptotecina, e consequentemente controle de liberação e vetorização em células específicas, em outro estudo as nanocápsulas promoveram a estabilidade de fármacos fotossensíveis como o anti-hipertensivo nifedipina, além de controlar e vetorizar sua liberação (GRANADA et al., 2013). Em estudo realizado por Noronha e colaboradores (2013) filmes a partir de nanocápsulas de PCL foram desenvolvidos com intuito de produzir embalagem ativas contendo o agente antioxidante α -tocolferol.

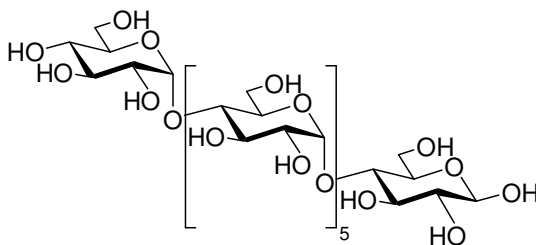
Sistemas de liberação controlada de fármacos a partir de copolímeros em bloco a base de PCL como parte hidrofóbica têm sido

amplamente empregados no setor farmacêutico. Allen e colaboradores (1999) desenvolveram micelas poliméricas a partir do copolímero PCL-*b*-PEO com alta capacidade de incorporação da di-hidrotestosterona e uma lenta e constante liberação que se manteve ao longo período de um mês. Savic e colaboradores (2003) avaliaram o potencial de vetorização de fármacos a partir de micelas de PCL-*b*-PEO seletivamente a alvos subcelulares específicos, sugerindo que estas micelas podem redirecionar a distribuição subcelular de um agente incorporado.

1.1.2 Maltoheptose-7-*bloco*-Poli(ϵ -caprolactona)_{5k} (Mal-*b*-PCL_{5k})

A maltoheptaose (Figura 7), análogo não cíclico da β ciclodextrina, é um oligossacarídeo linear constituído de sete unidades de glicose unidas por ligações α (1-4). Na literatura encontram-se poucos estudos relatando suas interações com fármacos (NAKAI et al., 1986; BETTINETTII et al., 1996) bem como sistemas nanocarreadores propícios para aplicação farmacêutica (LI, B. G.; ZHANG, 2008; ISONO et al., 2013; TAKUYA et al., 2013), dessa forma, apresentando-se como um oligossacarídeo inovador como constituinte hidrofílico de um copolímero em bloco.

Figura 7: Estrutura química do oligossacarídeo Maltoheptaose.



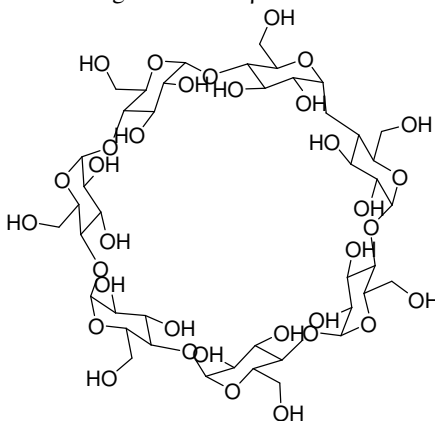
A síntese e caracterização de novos copolímeros em bloco anfifílicos com base na combinação de um segmento oligossacarídeo com um segmento de poliéster alifático sintético têm sido relatadas na literatura. Micelas esféricas foram formadas em fase aquosa a partir da auto associação do copolímero em bloco maltoheptaose-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (MH-*b*-PCL) e apresentaram uma distribuição

monodispersa. Além disso, estudos desses sistemas demonstraram que ao alterar o teor de bloco PCL hidrofóbico no copolímero o tamanho das micelas pode ser modulado (LI, B. G.; ZHANG, 2008). Otsuka e colaboradores (2010) relataram os estudos feitos de um copolímero híbrido e termossensível à base de maltoheptaose-*b*-poli(N-isopropilacrilamida) (Mal₇-*b*-PNIPAMn) sintetizado por “click chemistry” em que sua autoassociação conduziu a formação de morfologias como vesículas. A auto associação do copolímero maltoheptaose-*b*-polystyrene (MH-*b*-PS) com incorporação de partículas de ouro também foi estudada ocasionando a formação de vesículas de 30 nm (OTSUKA, I. et al., 2013b). Dessa forma, o copolímero sintetizado para este trabalho, Mal₇-*b*-PCL_{5k}, apresenta-se como candidato a obtenção de vesículas poliméricas para fármacos pouco solúveis em água, principalmente por apresentarem um bloco hidrofóbico biocompatível e biodegradável capaz de se autoassociar formando um núcleo reservatório para o agente hidrofóbico revestido por uma coroa hidrofílica polissacarídea capaz de estabilizar o sistema carreador em meio aquoso.

1.1.3 βCiclodextrina-*bloco*-Poli(ε-caprolactona)_{5k} (βCD-*b*-PCL_{5k})

As ciclodextrinas (Figura 8) são oligossacarídeos cíclicos constituídos por um número variável de unidades de glicose que se obtêm por ação da enzima ciclodextrina-α-glicosil transferase (CGTase) sobre o amido (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994). As ciclodextrinas naturais mais comuns apresentam seis, sete ou oito unidades de D(+)-glicopirranose unidas por ligações α(1,4) e denominam-se α-, β- e γ-ciclodextrinas, respectivamente, sendo a βciclodextrina mais utilizada na indústria farmacêutica. Essas moléculas apresentam estrutura tronco-cônica e se caracterizam por possuírem cavidade de natureza apolar devido à formação de um anel de grupos C-H (C₃), de um anel composto por átomos de oxigênio glicosídicos e, também, de outro anel de grupos C-H do carbono C₅ que contrasta com o exterior hidrofílico (SALTÃO; VEIGA, 2001; ROUX; PERLY; DJEDAINI-PILARD, 2007). A cavidade das ciclodextrinas pode acomodar moléculas, ou parte de moléculas, no seu interior, sem que haja o estabelecimento de ligações covalentes entre as duas entidades e este fenômeno denomina-se complexação podendo ocorrer quer em solução, quer no estado sólido.

Figura 8: Estrutura química do oligossacarídeo β ciclodextrina.



Uma grande variedade de análogos quimicamente modificados das ciclodextrinas tem sido sintetizada para melhorar as suas propriedades e, mais especificamente, a sua potência farmacológica (UEKAMA, K., 2004; CHALLA et al., 2005), surgindo assim estruturas adaptadas ao desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos (DUCHÊNE; WOUESSIDJEW, 1996; HIRAYAMA; UEKAMA, 1999). Dentre estes, os derivados anfífilos são arquitetados para a obtenção de estruturas moleculares organizadas a partir de sua autoassociação ou pela incorporação em membranas lipídicas que deverão melhorar a vetorização de fármacos complexados à ciclodextrinas. Estes derivados podem formar uma variedade de estruturas moleculares, tais como micelas, vesículas e VPs.

Copolímeros em bloco obtidos pela ligação de polímeros biodegradáveis sintéticos hidrofóbicos à ciclodextrina podem ser projetados para melhorar a sua anfifilicidade. Estruturas micelar núcleo-casca foram preparadas utilizando copolímeros em bloco constituídos por polímeros hidrofílicos contendo polietilenoglicol (PEG) e outro bloco contendo β CD com intuito de se tornarem potenciais sistemas nanocarreadores de fármacos (ZHANG, J.; MA, 2011). Qiu e colaboradores (2010) estudaram o efeito da liberação de um agente quimioterápico, a doxorrubicina, a partir de micelas poliméricas de copolímeros anfífilos constituídos de β CD com segmentos de polilactideo demonstrando que a quantidade de fármaco carregada aumentou proporcionalmente com a inserção de segmentos de

polilactideo, além disso, estas micelas apresentaram diminuição da resistência de células neoplásicas ao fármaco através da interação com polímero, indicando que este copolímero apresenta superioridade potencial para a terapia do cancro. Embora muitos estudos foram realizados com o intuito de conjugar as potencialidades das ciclodextrinas com novos sistemas terapêuticos como lipossomas (LOUKAS; VRAKA; GREGORIADIS, 1998; MCCORMACK; GREGORIADIS, 1998), nanopartículas (DUCHÊNE; WOUESSIDJEWÉ, 1996; LEMOS-SENA; WOUESSIDJEWÉ; DUCHÊNE, 1996; CAVALLI et al., 1999) e micropartículas (FILIPOVIC-GRCIC et al., 1996; UTSUKI et al., 1996), poucos copolímeros em bloco constituídos por ciclodextrinas ligadas a um bloco polimérico sintético hidrofóbico e biodegradável têm sido descritos na literatura, apontando, dessa forma, o caráter inovador do copolímero β CD-*b*-PCL_{5k}.

1.1.4 “Click chemistry”

A síntese dos copolímeros em bloco anfifílicos Mal₇-*b*-PCL_{5k} (Figura 9) e β CD-*b*-PCL_{5k} (Figura 10), foco deste trabalho, surge como uma aplicação promissora da “click chemistry” no desenvolvimento de estruturas com características aplicáveis na elaboração de sistemas carreadores de fármacos. A química “click” é um conceito introduzido por Kolb e colaboradores (2001) que descreve reações termodinamicamente favoráveis, capazes de conectar duas moléculas de forma simples e com altos rendimentos, sendo de grande aplicabilidade. Dentre as reações compreendidas neste conceito, o exemplo mais difundido como reação “click” é a cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica catalisada por Cu(I), com a formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-disubstituídos, conhecida como reação CuAAC.

Figura 9. Figura esquemática da síntese do copolímero em bloco $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$.

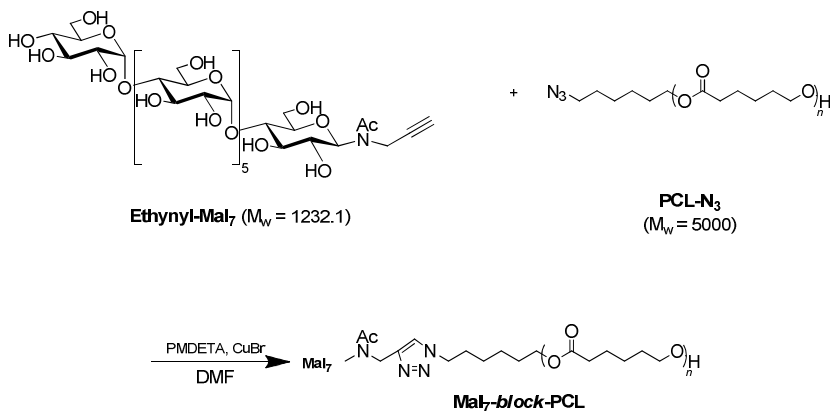
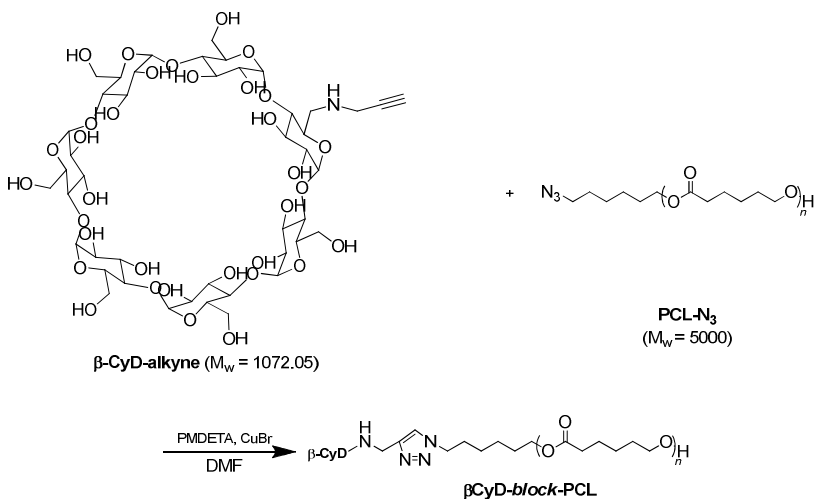


Figura 10. Figura esquemática da síntese do copolímero em bloco $\beta\text{CD-}b\text{-PCL}_{5k}$.



Inicialmente desenvolvida por Huisgen e colaboradores (1967), esta reação de cicloadição apresentou vários problemas como a necessidade de longos tempos reacionais, alta temperatura, baixo rendimento e a formação de uma mistura de regioisômeros triazólicos

1,4 e 1,5-dissubstituídos, quando alcinos assimétricos estão envolvidos na reação. Com a descoberta da versão da cicloadição catalisada por Cu(I) pelos estudos realizados concomitantemente pelos grupos de Sharpless e Meldal, a aplicabilidade desta reação começou a mudar, visto que a utilização de Cu(I) levou ao aumento da velocidade de reação em torno de 7 vezes, além da formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído em condições mais brandas e com alto rendimento (ROSTOVTSEV et al., 2002; TORNOE; CHRISTENSEN; MELDAL, 2002).

1.2 VESÍCULAS POLIMÉRICAS VISANDO USO TÓPICO

A pele é uma rota alternativa para administração de fármacos, permitindo a liberação controlada na corrente circulatória e evitando efeitos adversos geralmente observados pela via oral ou parenteral (BOLZINGER et al., 2012). O uso desta via pode aumentar a biodisponibilidade, evitar o metabolismo de primeira passagem do fígado e a degradação enzimática no sistema gástrico (SMITH; WOOD; DORNISH, 2004; LV et al., 2011). A penetração na pele é uma etapa essencial para que ocorra a liberação de fármacos na mesma (tratamentos dermatológicos) ou através desta (transdérmicos) (PATZELT et al., 2008b; BOLZINGER et al., 2012). Por outro lado, de um produto dermatológico destinado ao tratamento de patologias cutâneas é esperada a retenção do fármaco nas camadas da pele (SATO et al., 2007).

Muitos fatores podem afetar a liberação de fármacos na pele, tais como o massa molecular, lipofilicidade e grau de ionização da substância, a formulação, a presença de modificadores de permeação e o estado físico e grau de hidratação do estrato córneo (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; FÖRSTER et al., 2009; MIHRANYAN; FERRAZ; STROMME, 2012). Para que ocorra absorção em uma administração transdérmica, a substância deve possuir uma massa molar menor do que 500 g/mol, um baixo ponto de fusão, adequada solubilidade em óleo e água, e um coeficiente de partição octanol:água ($\log P$) de 1-3 (KORTING; SCHAFER-KORTING, 2010). Por outro lado, em formulações cosméticas e dermatológicas a absorção sistêmica deve ser evitada, sendo necessária somente a permeação cutânea por difusão da substância ativa na epiderme (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Alguns estudos indicam que a incorporação de fármacos lipofílicos em sistemas nanoestruturados pode formar simultaneamente cristais de fármacos durante a formação das mesmas

(CALVO; VILAJATO; ALONSO, 1996, POHLMANN et al., 2008) e, consequentemente influenciar suas propriedades no estado sólido, assim como sua estabilidade e desempenho do produto (SHEKUNOV; YORK, 2000). A cristalização do fármaco está relacionado principalmente as técnicas de preparo de nanopartículas realizadas pela dispersão de uma solução orgânica de polímero contendo o mesmo em meio aquoso, favorecendo a sua cristalização devido a supersaturação da solução atingida na etapa final quando se evapora o solvente. Dessa forma, deve se considerar ainda a influência destes cristais na liberação de fármacos a partir de sistemas nanoestruturados.

Conforme descrito neste capítulo, as vesículas poliméricas constituída de copolímeros em bloco anfífilicos são sistemas nanoparticulados que apresentam uma bicamada hidrofóbica/hidrofílica envolvendo um compartimento aquoso (BRINKHUIS; RUTJES; HEST, 2011). O tamanho de partícula, a morfologia e o potencial zeta são algumas características físico-químicas fundamentais para a estabilidade destes sistemas coloidais, e consequente aplicação terapêutica.

1.2.1 Caracterização físico-química das vesículas poliméricas

As técnicas utilizadas para a caracterização físico-química de vesículas poliméricas, empregadas neste estudo, incluem espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e potencial zeta.

1.2.1.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS)

O tamanho das VPs é considerado um dos principais parâmetros que caracterizam um sistema nanoestruturado, além de ser responsável por influenciar a absorção destes sistemas em mucosas e tecidos. Partículas menores são capazes de penetrar através das camadas submucosas, enquanto partículas de tamanho maiores podem permanecer retidas no revestimento epitelial (NAFEE et al., 2007). O monitoramento do tamanho das VPs obtidas a partir de diferentes condições experimentais é de extrema importância, pois fatores como método de preparo, velocidade de agitação, concentração de copolímero, entre outros podem influenciar o tamanho das partículas obtidas. Uma distribuição monodispersa em uma faixa de tamanho estreita é ideal para garantir a estabilidade (MAGENHEIM; BENITA, 1991; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Em formulações destinadas à aplicação tópica o

ideal é que o tamanho das partículas seja inferior a 600 nm (VERMA et al., 2003).

O espalhamento de luz é um método eficaz para a caracterização estrutural de polímeros e VPs em solução, pois a intensidade e a distribuição angular da luz espalhada dependem do tamanho e da forma das partículas que provocam o espalhamento em solução. A técnica de espalhamento dinâmico de luz mede, basicamente, a intensidade de luz espalhada pela amostra, com a qual se calcula a função de autocorrelação da intensidade, que é usada para determinar o coeficiente de difusão e o diâmetro médio das partículas. Ela é adequada para a determinação do tamanho de partículas dispersas em líquido, na faixa de dezenas de nanômetros a micrômetros.

Partículas em suspensão estão em movimento aleatório constante (movimento Browniano) devido à interação com as moléculas presentes no fluido dispersante. A técnica de espalhamento de luz é eficaz para se detectar flutuações temporais na intensidade de luz espalhada devido a flutuações de concentração e densidade da amostra. A flutuação medida do sinal da luz espalhada é autocorrelacionada no tempo através de uma função de correlação temporal, sendo possível a obtenção da frequência de relaxação (Γ), obtendo-se a partir dela o coeficiente de difusão translacional (D). Sendo que, o valor de coeficiente de difusão D é obtido pela determinação do coeficiente angular de um gráfico da frequência de relaxação (Γ) em função de q^2 .

Equação 2

$$\frac{\Gamma}{q^2} l_{q \rightarrow 0} = D$$

Onde Γ é a frequência de relaxação e q é o vetor de onda definido conforme equação abaixo.

Equação 3

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Onde λ é o comprimento de onda do feixe de luz incidente (632,8 nm), θ é o ângulo de espalhamento e n é o índice de refração do meio.

A função de autocorrelação serve não apenas para fornecer tamanho de partículas, mas também para mostrar a ocorrência de associação e entrelaçamento entre elas. A equação de Stokes-Einstein permite a determinação do raio hidrodinâmico (R_H) das partículas, com base na determinação do coeficiente de difusão (D), quando os valores de temperatura (T) e viscosidade (η) são conhecidos.

Equação 4

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann.

A morfologia da nanopartícula em suspensão também pode ser estimada por medidas de espalhamento de luz, a partir de uma relação entre o R_H com o raio de giração (R_g), denominado de parâmetro ρ . O R_g é calculado a partir da lei de Guinier das nanopartículas espalhadas, sendo que esta aproximação é válida apenas quando $qR_g < 1$ (SCHÄRTL, 2007). Na região de baixos valores de q , o valor de $I(q)$ é descrito pela equação:

Equação 5

$$\ln I = \ln I_0 - q^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right)$$

1.2.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica em transmissão (MET) é muito utilizada para observar a estrutura de materiais em escala nanométrica, e consiste no bombardeamento de uma porção ultrafina do material com um feixe de elétrons de alta tensão. A espessura da amostra deve ser bastante fina para que o feixe a atravesse sem haver muita absorção.

As análises de MET são empregadas com objetivo de adquirir informações sobre tamanho, dispersão e forma de sistemas nanoparticulados em soluções, sendo possível a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, por exemplo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

1.2.1.3 Potencial zeta

De acordo com a presença ou ausência de cargas na superfície, as VPs podem ser classificadas em iônicas ou não iônicas, respectivamente. A estimativa do potencial de superfície é capaz de identificar alterações na superfície das VPs. Apesar de alguns autores se referirem ao potencial zeta como a carga superficial da partícula, este valor corresponde ao potencial elétrico na interface da dupla camada,

sendo uma medida indireta da carga das partículas (GUNGOR et al., 2001; CAI; ODE; MURAKAMI, 2006; DELGADO et al., 2007).

A estabilidade de um sistema coloidal está diretamente relacionada à magnitude do seu potencial zeta (GAZORI et al., 2009). Valores de potencial zeta elevados, em módulo, em torno de 30mV, indicam suspensões de VPs mais estáveis fisicamente, pois a repulsão entre as partículas previne sua agregação. Os polímeros não iônicos tendem a reduzir o valor de potencial zeta, enquanto polímeros iônicos aumentam (COUVREY et al., 2002; SANTANDER-ORTEGA et al., 2010; POLETO et al., 2011).

1.2.2 Incorporação de fármacos em vesículas poliméricas

Dependendo da estrutura química do fármaco e do polímero, considera-se que o fármaco pode se localizar nas vesículas de três maneiras: na cavidade aquosa interna, no núcleo hidrofóbico da bicamada e na fase externa aquosa ou corona. A corona é um ambiente mais favorável para a solubilização de fármacos hidrofílicos, enquanto o núcleo é mais propício para fármacos hidrofóbicos, sendo estes o principal foco no desenvolvimento de formulações em sistemas vesiculares. O potencial de incorporação dos sistemas vesiculares ainda apresenta as possibilidades de produzir um sistema que contém dois ou mais componentes ativos: (1) um ativo solúvel na cavidade aquosa interna, ou um componente oleoso compatível com a porção hidrofóbica da bicamada, (2) e um outro componente hidrossolúvel incorporado na camada externa aquosa, para liberação simultânea (MYERS, 1992); encapsular moléculas de diferentes polaridades além de dimensões que podem ser ajustáveis de acordo com as características inerentes de cada segmento do copolímero em bloco.

Os parâmetros mais importantes na incorporação de fármacos em sistemas nanoestruturados são a capacidade de solubilização deste no copolímero (S_{cp}), que é a quantidade de fármaco solubilizada por grama de copolímero em uma dada solução, e a capacidade de solubilização do núcleo hidrofóbico (S_h), que é a quantidade de fármaco solubilizada por grama de bloco hidrofóbico. Estudos mostram que esses parâmetros não são fixos para um dado polímero, dependendo principalmente da compatibilidade química entre o núcleo e o fármaco. Além disso, a capacidade de solubilização do polímero pode também depender da temperatura, do pH, da concentração da solução do polímero, de aditivos na solução e do método de solubilização do fármaco (ALIABADI; LAVASANIFAR, 2006).

Quando se comparam copolímeros diferentes, fatores que alteram a S_{cp} são: o caráter hidrofóbico do núcleo, o comprimento do bloco hidrofóbico, a arquitetura do copolímero, a razão dos blocos hidrofóbico/hidrofílico, sua concentração e a temperatura micelar crítica. De uma forma geral, quanto mais hidrofóbico o núcleo das micelas (caráter químico das unidades monoméricas e maior comprimento da cadeia) maior a capacidade de solubilização para ativos insolúveis em água. Para copolímeros de composição e arquitetura similares, há um aumento na capacidade de solubilização com um aumento na cadeia hidrofóbica, e quanto à forma, micelas de forma cilíndrica possuem um núcleo mais eficiente de solubilização em comparação com micelas esféricas (ALLEN; MAYSINGER; EISENBERG, 1999; CROTHERS et al., 2002).

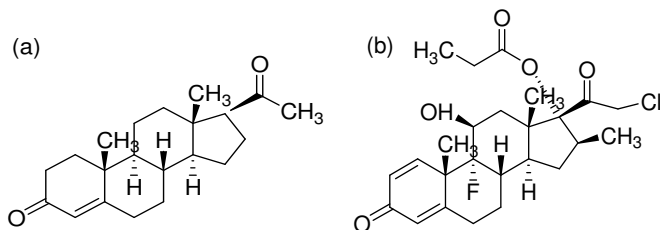
1.2.2.1 Fármacos modelos: progesterona e propionato de clobetasol

A progesterona (Figura 11a), (pregn-4-eno-3,20-diona), é um hormônio sexual com massa molecular de $314,46 \text{ g mol}^{-1}$ pertencente à classe dos progestógenos, sendo, dessa classe, o único hormônio natural. A principal função desse hormônio é preparar o útero da mulher para uma possível gestação e também estimular a produção de leite. Tem importância fundamental nos processos de menstruação, fecundação, transporte e implantação do óvulo fecundado, manutenção da gravidez e lactação (ZALANYI, 2001; F. BRAS. V, 2010). Na indústria farmacêutica, a progesterona é bastante utilizada para tratamento de reposição hormonal, amenorreia (menopausa), dismenorreia (cólicas menstruais), endometriose (presença do endométrio fora do útero), infertilidade, anticoncepção, alopecia androgênica (queda de cabelo), displasias mamárias (cisto nas mamas), mastodinia (dor mamária) (VIGO; LUBIANCA; CORLETA, 2011).

O propionato de clobetasol (Figura 11b), 9α -flúor-21-cloro-11 β -hidróxi-16 β -metilpregna-3,20-diona-1,4-dieno-17 α -propionato, é um glicocorticoide sintético com massa molecular de $466,97 \text{ g mol}^{-1}$ amplamente utilizado na indústria farmacêutica devido aos seus efeitos anti-inflamatórios não específicos e imunossupressor, provocando vasoconstrição e diminuição na síntese de colágeno (GAGLIARDI et al., 2000; HARDMAN; LIMBIRD, 2006). É administrado topicamente para o tratamento de processos inflamatórios como psoríase, eczemas relalcitrantes, lúpus eritematoso discoide,

dermatite atópica grave, neurodermatite grave, líquen plano, dermatoses de couro cabeludo e outras dermatites que não respondem satisfatoriamente aos esteroides menos potentes. O propionato de clobetasol pode apresentar efeitos colaterais indesejáveis após sua aplicação tópica, tais como queimadura, irritação, coceira, inchaço de pálpebras, face e lábios. Quando usado por período prolongado, este fármaco pode ser absorvido através da pele para o sistema circulatório, causando mudanças na pele, como afinamento, atrofia celular, mudanças de cor ou quantidade de cabelo, podendo ocorrer também supressão adrenal, retardo de crescimento em crianças, ganho de peso, glaucoma e aparecimento de acne (FANG et al., 1999).

Figura 11. Estrutura química da (a) progesterona e do (b) propionato de clobetasol.



Fonte: F. BRAS. V, (2010).

A incorporação dos fármacos modelos progesterona e propionato de clobetasol com diferentes sítios de ação, sistêmica e local, respectivamente, possibilita o estudo destas vesículas no que concerne a vetorização de fármacos por via tópica. A progesterona se destina a circulação sistêmica, em concentrações clinicamente eficazes, através da pele, enquanto o propionato de clobetasol deverá difundir-se através da membrana celular e complexar-se com receptores citoplasmáticos localizados em células dérmicas e intradérmicas (F. BRAS. V, 2010; ANVISA, 2014). As características físico-químicas (Tabela 1) são fatores que podem influenciar tanto a incorporação destes nos sistemas vesiculares quanto a penetração na pele.

Tabela 11. Características físico-químicas da progesterona e do propionato de clobetasol.

Fármaco	Massa Molecular	Ponto de fusão	Lop <i>P</i>	Solubilidade
Progesterona	314,46 g mol ⁻¹	126 a 131°C. Apresenta um polimorfo com ponto de fusão em torno de 121 °C	3,87	Praticamente insolúvel em água, solúvel em etanol, acetona e dioxana, pouco solúvel em óleos vegetais
Propionato de Clobetasol	466,97 g mol ⁻¹	196°C	3,5	Praticamente insolúvel em água, moderadamente solúvel em álcool, solúvel em acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido, dioxana e metanol, e levemente solúvel em benzeno e éter

Fonte: F. BRAS. V, (2010) e ANVISA (2014).

1.2.3 Permeação cutânea

O desenvolvimento de formulações de uso tópico exige estimativas prévias da taxa e da extensão de penetração do(s) composto(s) e adjuvante(s), através da pele. A pele humana é composta do extrato córneo (a camada mais externa), epiderme e derme, que juntos constituem uma barreira à penetração de agentes externos, devido a sua elevada organização estrutural e hidrofobicidade. O extrato córneo é composto de aproximadamente 40% de proteína, principalmente queratina, e 40% de água, apresentando caráter lipídico devido a

presença de ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídios (FOLDVARI, 2000; MENON, 2002). Modelos *in vivo* e *ex vivo* podem ser utilizados com este propósito (MUHAMMAD; RIVIERE, 2006). A permeação cutânea pode ser avaliada *in vitro* utilizando vários tipos de pele (peles humanas, de animais, artificiais ou modelo tecidual denominado equivalente dermal, DE), desenvolvido como uma alternativa para estudos de absorção dérmica em células de difusão, que são empregados para verificar a taxa de liberação *in vitro* de fármacos a partir de formulações tópicas, onde pele ou membranas sintéticas podem ser empregadas como barreiras ao fluxo do fármaco e do veículo (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Dentre os modelos animais, a pele de porco tem sido amplamente utilizada em função da sua similaridade estrutural e funcional com a pele humana, aliada à praticidade de obtenção deste material em abatedouros. Características comuns entre as peles, humana e suína, incluem a distribuição esparsa dos pelos, pigmentação e vascularização, bem como composição lipídica e propriedades biofísicas do estrato córneo (MUHAMMAD; RIVIERE, 2006; HASANOVIC et al., 2010); alguns estudos demonstraram que a permeação de fármacos é bastante similar entre ambas (CHANG et al., 1994; HERKENNE et al., 2006). Os primeiros modelos de precursores dos DE mimetizavam parcialmente a pele, representando individualmente cada camada tecidual. Bell e colaboradores (1979) foram os pioneiros no preparo dos modelos modernos com estrutura tridimensional a partir da combinação de cultura de fibroblastos, queratinócitos e uma matriz de colágeno. Atualmente os DE são empregados como substitutos da pele humana em diferentes áreas tecnológicas como a biologia molecular, farmacologia, cosmética, engenharia tecidual e clínica médica (EHRlich; WHITE, 1983; PONEC, 1991; GAY et al., 1992).

O modelo de difusão da câmara de Franz, também chamado de modelo estático, tem ampla aplicabilidade em estudos de permeabilidade e permeação *in vitro* (FRANTZ, 2000). Após o preparo do tecido (seccionamento da porção de interesse), este é colocado entre dois compartimentos, denominados de compartimento doador (ou superior) e receptor (ou inferior). O estrato córneo da pele encontra-se voltado para o compartimento doador, enquanto que a derme para o receptor. O compartimento receptor é preenchido com uma solução, geralmente tamponante, evitando-se a formação de bolhas, já que as mesmas podem alterar a área de difusão. No compartimento superior é colocada uma solução do fármaco ou a solução a ser testada. Os experimentos são realizados geralmente a 37° C (temperatura corporal),

sob agitação constante e controlada. Alíquotas da solução receptora são coletadas, em diferentes tempos, e efetua-se a quantificação do fármaco ou adjuvante farmacêutico. As metodologias para quantificação mais utilizadas são técnicas espectrofotométricas e cromatográficas. Finalmente, os parâmetros de permeabilidade são calculados (FORSTER et al., 2009; KORTING; SCHAFER-KORTING, 2010).

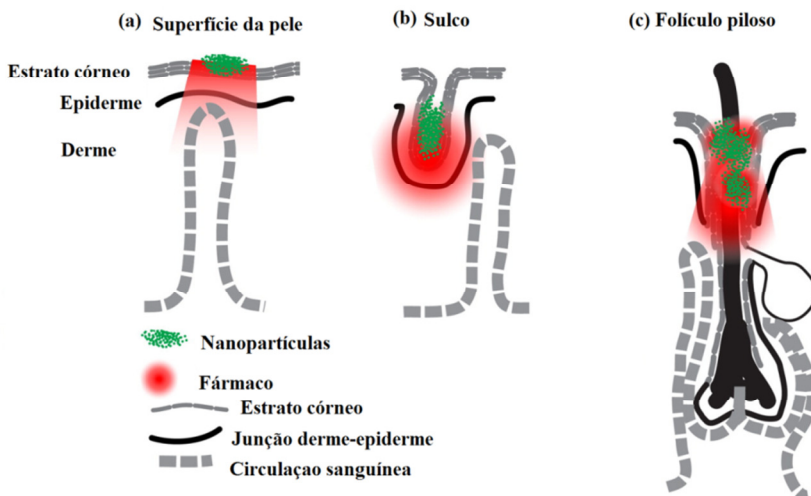
1.2.3.1 Rotas de permeação cutânea

As VPs de uso tópico liberam o fármaco em diferentes locais da pele (Figura 12), essas moléculas são transferidas do meio externo para o estrato córneo através de três rotas principais: via transcelular e intercelular e através dos apêndices (PROW, T.W. et al., 2011).

Na rota intercelular as moléculas interagem com a matriz lipídica, sem penetrar através das células. Esta via é descrita como a rota predominante de permeação, especialmente para moléculas lipofílicas (KORTING; SCHAFER-KORTING, 2010; ARAYACHUKAT; WANICHWECHARUNGRUANG; TREE-UDOM, 2011).

Na via transcelular, as moléculas (predominantemente hidrofílicas) atravessam as membranas das células por difusão e a barreira limitante é a bicamada lipídica (BUCK, 2004; PATZELT et al., 2008a). Entretanto, o transporte de moléculas por esta via pode ser restrito pela presença das junções epiteliais encontradas principalmente no estrato granuloso (PROW et al., 2011).

Figura 12. Rotas de penetração de VPs através do estrato córneo



Fonte: Adaptado de PROW et al., (2011).

Os apêndices apresentam uma rota paralela, na qual macromoléculas, íons e fármacos polares de baixo peso molecular podem permear, especialmente através dos folículos pilosos (SUHONEN; BOWSTRA; URTII, 1999; PATZELT et al., 2008a)

2 REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SARAF, S.; ASTHANA, A.; GUPTA, U.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N. K. Ligand based dendritic systems for tumor targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, n. 1-2, p. 3-13, 2008.

ALIABADI, H. M.; LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, n. 1, p. 139-162, 2006.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 16, n. 1-4, p. 3-27, 1999.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. V.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, p.325-340, 2007.

ARAYACHUKAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. P.; TREE-UDOM, T. Retinyl acetate-loaded nanoparticles: Dermal penetration and release of the retinyl acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 281-288, 2011.

BATES, F. S.; FREDRICKSON, G. H. Block copolymer thermodynamics: Theory and Experiment Annual Review of Physical Chemistry. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 525-557, 1990.

BELL, E.; IVARSSON, B.; MERRILL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 3, p. 1274-1278, 1979.

BETTINETTI, G. R.; MURA, R.; MELANI, F.; RILLOSI, M.; GIORDANO, F. Interactions Between Naproxen and Maltoheptaose, the Non-Cyclic Analog of β -Cyclodextrin. **Journal of Inclusion**

Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry, v. 25, p. 327-338, 1996.

BLANAZS, A.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, n. 4-5, p. 267-277, 2009.

BOLZINGER, M.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BRINKHUIS, R. P.; RUTJES, F. P. J. T.; HEST, J. C. M. Polymeric vesicles in biomedical applications. **Polymer Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 1449-1462, 2011.

BRIONES, E.; COLINO, C. I.; LANA O, J. M. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. **Journal Control Release**, v. 125, n. 3, p. 210-227, 2008.

BUCK, P. S. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. **The International Journal of Aromatheraphy**, v. 14, n. 2, p. 70-76, 2004.

BURCHARD, W. Structure formation by polysaccharides in concentrated solution. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 342-353, 2001.

CAI, K.; ODE, M.; MURAKAMI, H. Influence of polyelectrolyte dispersants on the surface chemical properties of aluminum in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 284, p. 458-463, 2006.

CALVO, P.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530 -536 1996.

CAON, T.; PORTO, L. C.; GRANADA, A.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A.; SIMOES, C. M.; BORSALI, R.; SOLDI, V. Chitosan-

decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n., p. 165-172, 2014.

CARLSEN, A.; LECOMMANDOUX, S. Self-assembly of polypeptide-based block copolymer amphiphiles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 329-339, 2009.

CAVALLI, R.; PEIRA, E.; CAPUTO, O.; GASCO, M. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, n. 1, p. 59-69, 1999.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, 1998.

CHANG, S. K.; WILLIAMS, P. L.; DAUTERMAN, W. C.; RIVIERE, J. E. Percutaneous absorption, dermatopharmacokinetics and related biotransformation studies of carbaryl, lindane, malathion, and parathion in isolated perfused porcine skin. **Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 269-280, 1994.

CHOUCAIR, A.; LAVIGUEUR, C.; EISENBERG, A. Polystyrene-b-poly(acrylic acid) vesicle size control using solution properties and hydrophilic block length. **Langmuir**, v. 20, n. 10, p. 3894-3900, 2004.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 9, n. 2, p. 99-134, 2002.

CROTHERS, M.; ATTWOOD, D.; COLLETT, J. H.; YANG, Z.; BOOTH, C.; TABOADA, P.; MOSQUERA, V.; RICARDO, N. P. S.; MARTINI, L. G. A. Micellization and Gelation of Diblock Copolymers

of Ethylene Oxide and Styrene Oxide in Aqueous Solution. **Langmuir**, v. 18, n. 22, p. 8685-8691, 2002.

DELGADO, A. V.; GONZALEZ-CABALLERO, F.; HUNTER, R. J.; KOOPAL, L. K.; LYKLEMA, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, n. 2, p. 194-224, 2007.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547-2565, 2007.

DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer vesicles. **Science**, v. 297, n. 5583, p. 967-973, 2002.

DU, J.; O'REILLY, R. K. Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. **Soft Matter**, v. 5, n. 19, p. 3544-3561, 2009.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWÉ, D. Amphiphilic cyclodextrins and targeting of drugs. In: International Symposium on Cyclodextrins, Budapest:Kluwer Academic Publishers, p. 423-430,1996.

EHRlich, H. P.; WHITE, M. E. Effects of Increased Concentrations of Prostaglandin-E Levels with Epidermolysis Bullosa Dystrophica Recessive Fibroblasts within a Populated Collagen Lattice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, n. 6, p. 572-575, 1983.

FANG, J. Y.; SHEN, K. L.; HUANG, Y. B.; WU, P. C.; TSAI, Y. H. Evaluation of topical application of clobetasol 17-propionate from various cream bases. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 1, p. 7-14, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. São Paulo: **Atheneu**, 2010.

FARRELL, R. A.; FITZGERALD, T. G.; BORAH, D.; HOLMES, J. D.; MORRIS, M. A. Chemical Interactions and Their Role in the Microphase Separation of Block Copolymer Thin Films. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, n. 9, p. 3671-3672, 2009.

FILIPOVIC-GRČIĆ, J.; BEČIĆ-REVIĆ-LACAN, M.; SKALKO, N.; JALSENJAK, I. Chitosan microspheres of nifedipine and nifedipine-cyclodextrin inclusion complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 135, n. 1-2, p. 183-190, 1996.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FORSTER, M.; BOLZINGER, M. A.; FESSI, H.; BRIANCON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-323, 2009.

FÖRSTER, M.; BOLZINGER, M.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-323, 2009.

FRANTZ, S. W. Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells in methodology for skin absorption. In: Press, C. (Ed.). **Method for skin absorption**. Florida, 2000.

FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in Pharmacy**. Dordrecht: London: Kluwer Academic Publishers, v.5, 1994.

GAGLIARDI, L.; DE ORSI, D.; MANNA, F.; TONELLI, D. Hplc determination of clobetasol propionate in cosmetic products. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 3, p. 355-362, 2000.

GAY, R.; SWIDEREK, M.; NELSON, D.; ERNESTI, A. The Living Skin Equivalent as a Model In vitro for Ranking the Toxic Potential of Dermal Irritants. **Toxicology in Vitro**, v. 6, n. 4, p. 303-315, 1992.

GAZORI, T.; KHOSHAYAND, M.; AZIZI, I.; YAZDIZADE, P.; NOMANI, A.; HARIRIAN, I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization

and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 599-606, 2009.

GOHY, J. F. Block Copolymer Micelles. **Advances in Polymer Science**, v. 190, p. 65-136, 2005.

GRANADA, A.; MURAKAMI, F. S.; SARTORI, T.; LEMOS-SENNA, E.; SILVA, M. A. Development and validation of an HPLC method to quantify camptothecin in polymeric nanocapsule suspensions. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 3, p. 551-556, 2008.

GRANADA, A.; TAGLIARI, M. P.; SOLDI, V.; SILVA, M. A.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; FERNANDES, D.; STULZER, H. K. Nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: validation of a stability-indicating HPLC method to evaluate the drug entrapment efficiency and in vitro release profiles. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 2, p. 276-281, 2013.

GUNGOR, N.; ALEMDAR, A.; ATICI, A.; ECE, O. The effect of SDS surfactant on the flow and zeta potential of bentonite suspensions. **Materials Letters**, v. 51, n. 3, p. 250-254, 2001.

GUPTA, U.; AGASHE, H. B.; ASTHANA, A.; JAIN, N. K. A review of in vitro-in vivo investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers. **Nanomedicine**, v. 2, n. 2, p. 66-73, 2006.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HAMLEY, I. W. Nanostructure fabrication using block copolymers. **Nanotechnology**, v. 14, n. 10, p. R39-R54, 2003.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, p.1047-1050, 2006.

HASANOVIC, A.; HOLLICK, C.; FISCHINGER, K.; VALENTA, C. Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 148-153, 2010.

HE, W.; GUO, X.; ZHANG, M. Transdermal permeation enhancement of N-trimethyl chitosan for testosterone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1-2, p. 82-87, 2008.

HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; HADGRAFT, J.; GUY, R. H. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1850-1856, 2006.

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 125-141, 1999.

HOUGA, C.; GIERMANSKA, J.; LECOMMANDOUX, S.; BORSALI, R.; D., T.; GNANOU, Y.; J.F., L. M. Micelles and Polymersomes Obtained by Self-Assembly of Dextran and Polystyrene Based Block Copolymers. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 1, p. 32-40, 2008.

HUISGEN, R.; SZEIMIES, G.; MOEBIUS, L. 1,3-Dipolar cycloadditions. XXXII. Kinetics of the addition of organic azides to carbon-carbon multiple bonds. **Chemische Berichte**, v. 100, n., p. 2494-2507, 1967.

ISONO, T.; OTSUKA, I.; SUEMASA, D.; ROCHAS, C.; SATOH, T.; BORSALI, R.; KAKUCHI, T. Synthesis, Self-Assembly, and Thermal Caramelization of Maltoheptaose-Conjugated Polycaprolactones Leading to Spherical, Cylindrical, and Lamellar Morphologies. **Macromolecules**, v. 46, n. 22, p. 8932-8940, 2013.

JONES, M.; LEROUX, J. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, n. 2, p. 101-111, 1999.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 113-131, 2001.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001.

KORTING, H. C.; SCHAFER-KORTING, M. Carriers in the topical treatment of skin disease. **Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology**, v., n. 197, p. 435-468, 2010.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KWON, G. S.; OKANO, T. Polymeric micelles as new drug carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21 n. 2, p. 107-116, 1996.

LEE, J. S.; FEIJEN, J. Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization. **Journal Control Release**, v. 161, n. 2, p. 473-483, 2012.

LEMOS-SENA, E.; WOUESSIDJEWE, D.; DUCHÊNE, D. Release profiles of a hydrophobic drug incorporated in modified cyclodextrin nanospheres. In: International Symposium on Cyclodextrins, Budapest:Kluwer Academic Publishers, p. 431-434, 1996.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 259-269, 2007.

LI, B. G.; ZHANG, L. M. Synthesis and characterization of novel amphiphilic block copolymers based on maltoheptaose. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 390-395, 2008.

LI, H.; KOCHHAR, J. S.; PAN, J.; CHAN, S. Y.; KANG, L. Nano/microscale technologies for drug delivery. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 11, n. 2, p. 337-367, 2011.

LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Amphiphilic molecules: small and large. In: Lindman, P. A. A. B. (Ed.). **Amphiphilic Block Copolymers**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., p.1-12, 2000.

LINSE, P. Modelling of the self-assembly of block copolymers in selective solvent In: (Ed.). **Amphiphilic Block Copolymers**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., p.13-40, 2000.

LIU, J. Y.; ZHANG, L. M. Preparation of a polysaccharide-polyester diblock copolymer and its micellar characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 196-201, 2007.

LOUKAS, Y.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Drugs in cyclodextrins in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1, p. 137-142, 1998.

LV, H. X.; ZHANG, Z. H.; WANG, X. P.; CHENG, Q. Q.; WANG, W.; HUANG, X. H.; ZHOU, J. P.; ZHANG, Q.; HOU, L. L.; HUO, W. A biomimetic chitosan derivatives: preparation, characterization and transdermal enhancement studies of N-arginine chitosan. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6778-6790, 2011.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n., p. 221-241, 1991.

MCCORMACK, B.; GREGORIADIS, G. Drugs in cyclodextrins in liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1, p. 59-69, 1998.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. S3-S17, 2002.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 5, p. 875-910, 2012.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 18, n. 6, p. 527-550, 2001.

MUHAMMAD, F.; RIVIERE, J. E. In vivo models. In: Riviere, J. E. E. (Ed.). **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York:, 2006.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p., 2004.

MYERS, D. **Surfactant Science and Technology** secondary title. New Yor, 1992.

NAFEE, N.; TAETZ, S.; SCHNEIDER, M.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. **Nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 173-183, 2007.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NAKAI, Y.; YAMAMOTO, K.; TERADA, K.; UENO, Y. Effects of the degree of polymerization of oligosaccharides on the properties of ground mixtures. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 315-319, 1986.

NORONHA, C. N.; GRANADA, A. F.; CARVALHO, S. M.; LINO, R. C.; MACIEL, V. O. B.; BARRETO, P. L. M. Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops & Products**, v. 50, n., p. 896-903, 2013.

OTSUKA, I.; FUCHISE, K.; HALILA, S.; FORT, S.; AISSOU, K.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; CHEN, Y.; NARUMI, A.; KAKUCHI, T.; BORSALI, R. Thermoresponsive vesicular morphologies obtained by self-assemblies of hybrid oligosaccharide-block-poly(N-

isopropylacrylamide) copolymer systems. . **Langmuir**, v. 26, n. 4, p. 2325-2332, 2010.

OTSUKA, I.; TALLEGAS, S.; SAKAI, Y.; ROCHAS, C.; HALILA, S.; FORT, S.; BSIESY, A.; BARON, T.; BORSALI, R. Control of 10 nm scale cylinder orientation in self-organized sugar-based block copolymer thin films. **Nanoscale**, v. 5, n. 7, p. 2637-2641, 2013.

PATZELT, A.; ANTONIOU, C.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Skin penetration from the inside to the outside: a review. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 2, p. 229-235, 2008b.

POLETTTO, F. S.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. In: Beck, R. G., S. S.; Pohlmann, A. (Eds.) (Ed.). **New approaches for skin care. Nanocosmetics and Nanomedicines**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.380, 2011.

POHLMANN, A. R.; MEZZALIRAA, G.; VENTURINI, C. G.; CRUZA, L.; BERNARDI, A.; JAGER, E.; BATTASTINI, A. M. O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, p. 288–293, 2008.

PONEC, M. Reconstruction of Human Epidermis on De-Epidermized Dermis - Expression of Differentiation-Specific Protein Markers and Lipid-Composition. **Toxicology in Vitro**, v. 5, n. 5-6, p. 597-606, 1991.

PORTO, L. C. **Estudo de filmes finos e de nanopartículas obtidos pela auto-associação de copolímeros em bloco e sua interação com um oligo/polissacarídeo**. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, p.171, 2011.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; ROBERTSON, T. A.; ROBERTS, M. S.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; SOYER, H. P. Nanoparticles and microparticles for skin

drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

QIU, L. Y.; WANG, R. J.; ZHENG, C.; JIN, Y.; JIN LE, Q. Beta-cyclodextrin-centered star-shaped amphiphilic polymers for doxorubicin delivery. **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 193-208, 2010.

RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ, J.; CHÉCOT, F.; GNANOU, Y.; LECOMMANDOUX, S. Towards "smart" nano-objects by self assembly of block copolymers in solution. **Progress in Polymer Science**, v. 30, n. 7, p. 691-724, 2005.

ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 14, p. 2596-2599, 2002.

ROUX, M.; PERLY, B.; DJEDAINI-PILARD, F. Self-assemblies of amphiphilic cyclodextrins. **European Biophysics Journal**, v. 36, n. 8, p. 861-867, 2007.

RUOZI, B.; TOSI, G.; LEO, E.; VANDELLI, M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. **Talanta**, v. 73, n. 1, p. 12-12, 2007.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Cyclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2001.

SANTANDER-ORTEGA, M. J.; LOZANO-LOPEZ, M. V.; BASTOS-GONZALEZ, D.; PEULA-GARCIA, J. M.; ORTEGA-VINUESA, J. L. Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces. **Colloid and Polymer Science**, v. 288, n. 2, p. 159-172, 2010.

SATO, M. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. R. Permeação cutânea in vitro do ácido fólico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SAULNIER, P.; ANTON, N.; HEURTAULT, B.; BENOIT, J. P. Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, n. 3, p. 221-228, 2008.

SAVIC, R.; LUO, L.; EISENBERG, A.; MAYSINGER, D. Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 615-618, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHEKUNOV, B.; CHATTOPADHYAY, P.; TONG, H.; CHOW, A. Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 2, 2006.

SHEN, Z.; LI, Y.; KOHAMA, K.; ONEILL, B.; BI, J. Improved drug targeting of cancer cells by utilizing actively targetable folic acid-conjugated albumin nanospheres. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 1, p. 51-58, 2011.

SMART, T.; LOMAS, H.; MASSIGNANI, M.; FLORES-MERINO, M. V.; PEREZ, L. R.; BATTAGLIA, G. Block copolymer nanostructures. **Nanotoday**, v. 3, n. 3-4, p. 38-36, 2008.

SMITH, J.; WOOD, E.; DORNISH, M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2004.

SOO, P. L.; EISENBERG, A. Preparation of Block Copolymer Vesicles in Solution **Journal of Polymer Science. Part B**, v. 42, n. 6, p. 923-938, 2004.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

SUHONEN, T. M.; BOWSTRA, J. A.; URTIL, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alternations. . **Journal of Controlled Release**, v. 59, n. 2, p. 149-161, 1999.

TAKUYA, I.; OTSUKA, I.; KONDO, Y.; HALILA, S.; FORT, S.; ROCHAS, C.; SATOH, T.; BORSALI, R.; KAKUCHI, T. Sub-10 nm Nano-Organization in AB2 and AB3 Type Miktoarm Star Copolymers Consisting of Maltoheptaose and Polycaprolactone. **Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 1461-1469, 2013.

TORNOE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 3057-3064, 2002.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug fomulation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 900-915, 2004.

UTSUKI, T.; BREM, H.; PITHA, J.; LOFTSSON, T.; KRISTMUNDSDOTTIR, T.; TYLER, M.; OLIVI, A. Potentiation of anticancer effects of microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl- α -cyclodextrin. **Journal of Controlled Release**, v. 40, n. 3, p. 251-260, 1996.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of lipossomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1-2, p. 141-151, 2003.

VIGO, F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, H. V. E. Progestógenos: farmacologia e uso clínico. **Femina**, v. 39, n. 3, p. 126-137, 2011.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YADAV, S. C.; KUMARI, A.; YADAV, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 173-187, 2011.

YU, K.; ZHANG, L.; EISENBERG, A. Novel morphologies of "crew-cut" aggregates of amphiphilic diblock copolymers in dilute solution. **Langmuir**, v. 12, n. 25, p. 5980-5984, 1996.

ZALANYI, S. Progesterone and ovulation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 98, n. 2, p. 152-159, 2001.

ZAMBONI, W. C. Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 23, p. 8230-8234, 2005.

ZHANG, J.; MA, P. X. Core-shell structured nanoassemblies based on beta-cyclodextrin containing block copolymer and poly(beta-benzyl L-aspartate) via host-guest complexation. **Polymer**, v. 52, n. 21, p. 4928-4937, 2011.

ZHANG, L.; SHEN, H.; EISENBERG, A. Phase Separation Behavior and Crew-Cut Micelle Formation of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Copolymers in Solutions. **Macromolecules**, v. 30, n. 4, p. 1001-1011, 1997.

CAPÍTULO 3

ARTIGO 1 - NOVEL HYBRID BLOCK COPOLYMER NANOCARRIER SYSTEMS TO LOAD LIPOPHILIC DRUGS PREPARED BY MICROPASE INVERSION METHOD

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Os copolímeros em bloco constituídos por segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos têm atraído grande atenção como sistemas carreadores de fármacos devido ao seu comportamento único de auto-organização em meio aquoso. Esta habilidade de se auto-organizar em estruturas ordenadas ocorre devido à incompatibilidade dos diferentes blocos e depende tanto da natureza química dos blocos, quanto da estrutura molecular do copolímero (QUAGLIA et al., 2008).

Na maioria dos estudos, as VPs preparadas a partir de copolímeros em bloco anfifílicos são capazes de solubilizar diversas substâncias hidrofóbicas em seu núcleo, pois são formadas a partir de copolímeros dibloco AB e triblocos do tipo ABA ou BAB, onde A é o bloco hidrofóbico formador do núcleo, e B é o bloco hidrofílico formador da casca. Particularmente interessantes são os copolímeros em bloco que combinam características vantajosas de polímeros sintéticos, tais como, solubilidade, processabilidade, elasticidade; com aquelas de polímeros naturais como polissacarídeos e proteínas, funcionalidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (CARLSEN; LECOMMANDOUX, 2009).

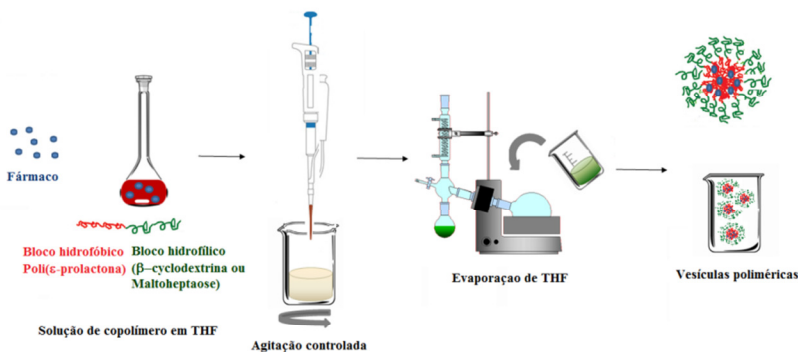
O desenvolvimento de VPs a partir da autoassociação de copolímeros em bloco, formados a partir de um bloco natural biodegradável e um bloco polimérico sintético biodegradável, é proposto neste trabalho como uma estratégia para a obtenção de sistemas coloidais sem a necessidade do uso de surfactantes. Os diblocos anfifílicos constituídos por PCL como bloco hidrofóbico sintético e oligossacarídeos como bloco hidrofílico, correspondendo a maltoheptaose e β CD, foram sintetizados via ciclo-adição 1,3-dipolar catalisada por cobre (“click chemistry”). Esta estratégia contorna problemas de incompatibilidade entre os oligossacarídeos em relação à baixa reação de acoplamento (LIU et al., 1997).

A obtenção de micelas ou vesículas a partir de copolímeros em bloco é possível com base em duas metodologias principais: dissolução direta e diálise, dependendo, sobretudo da solubilidade do copolímero. Se o copolímero for relativamente hidrossolúvel, a dissolução direta é empregada; enquanto que a diálise é empregada quando o copolímero não apresenta boa solubilidade em solução aquosa. Neste caso, o copolímero é primeiramente solubilizado em solvente orgânico miscível

em água, tal como dimetilformamida ou tetrahidrofurano e então dialisado em água ultrapura, conduzindo à formação das VPs. A autoassociação ocorre quando uma quantidade crítica de água é adicionada à mistura, sendo dependente das propriedades físicas do copolímero em bloco, como o comprimento do bloco hidrofóbico e a concentração do copolímero. Além disso, diferenças na morfologia e no tamanho das partículas podem ser obtidas dependendo do solvente utilizado, assim como da velocidade da adição de água ao sistema (ALLEN; MAYSINGER; EISENBERG, 1999). Em sistemas nanoparticulados com vistas à incorporação e, posterior, liberação de fármacos o método de diálise deve ser adaptado para que o solvente orgânico seja eliminado sob pressão reduzida, pois neste caso, a diálise favoreceria a liberação precoce do fármaco logo após sua incorporação.

Este capítulo descreve o desenvolvimento de vesículas poliméricas de β CD-*b*-PCL_{5k} bem como de Mal₇-*b*-PCL_{5k} para incorporação de fármacos hidrofóbicos a partir da técnica denominada de inversão da microfase em água (Figura 1) em que os copolímeros são solubilizado em tetrahidrofurano e então adicionados gota a gota sob água sendo, posteriormente, conduzidos a um rotavapor para eliminação do solvente orgânico (ZHAO et al., 2001). Após a caracterização físico-química das vesículas, as concentrações ideais dos componentes foram estabelecidas e realizadas a incorporação de dois fármacos hidrofóbicos como modelo de aplicação tópica, progesterona e propionato de clobetasol, em cada sistema.

Figura 1: Representação esquemática de preparação de vesículas poliméricas contendo fármaco pela técnica de inversão da microfase em água.



Neste trabalho, os fármacos hidrofóbicos incorporados, progesterona e propionato de clobetasol, foram escolhidos como modelo para aplicação tópica. A preparação e caracterização das vesículas poliméricas β CD-*b*-PCL e Mal₇-*b*-PCL contendo progesterona e propionato de clobetasol encontram-se redigidas sob a forma de artigo. Neste trabalho, as vesículas poliméricas são caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, morfologia, potencial zeta e teor de fármacos.

Novel hybrid block copolymer nanocarrier systems to load lipophilic drugs prepared by microphase inversion method

Andrea Granada^b, Issei Otsuka^a, Thiago Caon^b, Marcos Antonio Segatto Silva^b, Valdir Soldi^{c*} and Redouane Borsali^a

^a Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV – CNRS UPR 5301), affiliated with Université de Grenoble-Alpes, member of the Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG – CNRS FR 2607), of the PolyNat Carnot Institute and of the Arcane LabEx, Domaine Universitaire de Grenoble, 601 rue de la Chimie, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

^b Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

* Corresponding Author: Valdir Soldi

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900, Florianópolis – SC, Brasil.
E-mail: soldi.valdir@gmail.com

ABSTRACT

Nanoparticles (VPs) based on block copolymers (BCPs) of oligosaccharides [β cyclodextrin (β CyD) and maltoheptaose (Mal₇)] and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) were prepared by microphase inversion method. Zeta-potential, particle size measurements and morphological analysis of drug-free and drug-loaded nanoparticles were performed by using, respectively, laser-doppler anemometry, dynamic and static light scattering and transmission electron microscopy. ρ -Ratio values were correlated with transmission electron microscopy observations. Both types of amphiphilic block copolymers, β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal₇-*b*-PCL_{5k}, self-assembled in water to form spherical vesicles, presented a hydrodynamic diameter of 72 and 34 nm, respectively. The incorporation of drugs into nanoparticles did not affect significantly the particle size for β CyD-*b*-PCL_{5k}-based nanoparticles with progesterone, unlike the other tested systems. On the other hand, all nanoparticles (with and without drug) were negatively charged. Both nanoparticulate systems showed high drug loading efficiency (higher than 98 %), confirming their suitability as delivery system for lipophilic drugs.

1 INTRODUCTION

In general, amphiphilic structure present self-assembling molecules, containing both hydrophobic and hydrophilic domains such as block copolymers (BCPs). Amphiphilic molecules in water are the most studied example of self-assembling molecules in selective solvents. A selective solvent will preferentially dissolve one part of a molecule over another. Undoubtedly, the ability to prepare nanoparticles in solution and, particularly in aqueous medium, can be great advantage for biomedical applications such as the delivery of therapeutics (SMART et al., 2008). In particular, the self-assembly at the nanoscale of the natural/synthetic hybrid BCPs systems offers a promising way as drug delivery systems (MAZZARINO, L. et al., 2014).

In the last few year, a notable interest in the development of hybrid BCPs containing oligo- or polysaccharides has been shown since the latter are well-known to possess a high tendency to associate (OTSUKA, I.; et al., 2010; OTSUKA, I. et al., 2012a; OTSUKA, I. et al., 2012b; ISONO et al., 2013; OTSUKA, I. et al., 2013a; OTSUKA, I. et al., 2013b). The association mechanisms usually involve abundant hydroxyl or amino groups from the macromolecule, which easily form hydrogen bonds (BURCHARD, 2001). Moreover, saccharides are a very diverse class of polymeric materials of natural origin, which may be considered relatively safe, non-toxic, hydrophilic and biodegradable (desirable for pharmaceutical applications). Some saccharides such as cyclodextrins (CyDs) and maltoheptaose₇ (Mal₇) are bioactive and thus they may also be used to improve the therapeutic efficacy of an associated drug or can enhance the targeting ability of a carrier system (DUMITRIU, 2001; LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004). Cyclodextrins are a series of cyclic oligomers, which are produced from amylose fraction of starch by glucosyltransferases (SAENGER et al., 1998) and Mal₇, a noncyclic analog of β -cyclodextrin (BETTINETTII et al., 1996), is a renewable oligosaccharide derived from starch, which is composed of seven α -1,4-linked glucopyranosyl units.

Although CyDs have been used for decades to improve the solubility of poorly soluble drugs (DALMORA; DALMORA; OLIVEIRA, 2001; ARCHONTAKI; VERTZONI; ATHANASSIOU-MALAKI, 2002; UEKAMA, K., 2004; UEKAMA, K. , 2004; HE et al., 2008; MAHMOUD et al., 2011; AMMAR, H. O., EL-NAHHAS, S. A.,

GHORAB, M. M., SALAMA, A. H., 2012; AMMAR, H. O. et al., 2012), hybrid copolymer systems composed of CyDs have been underexplored (GUO, Y. L.; CUI; HAN, 2013). As one of the most prominent biodegradable and biocompatible polymers, poly(ϵ -caprolactone) is widely used in the field of tissue engineering and drug delivery (GRANADA et al., 2008; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; GRANADA et al., 2013; NORONHA et al., 2013). If this polymer is grafted into cyclodextrins, original amphiphilic biodegradable copolymers may be obtained. BCPs nanoparticles have a spherical core/shell structure, where the hydrophobic core acts as a nano-depot for accommodation of hydrophobic drugs and the hydrophilic shell interfaces the biological media (WEBBER, 1998; O'REILLY, 2007). Saccharide groups (Mal₇ and β CyD) have been used to constitute the hydrophilic outer shell and a core-forming is due to PCL block. Systems combining poly(ϵ -caprolactone) and Mal₇ have already been described by our research team (ISONO et al., 2013; OTSUKA, I. et al., 2013a) however, these polymeric VPs were prepared by thermal processes.

Thus, this study aimed to develop vesicles polymeric (VPs) based on the β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal₇-*b*-PCL_{5k} diblock copolymers by microphase inversion method to load lipophilic drugs considering the individual advantages of these materials. Moreover, an amphiphilic block copolymer combining poly(ϵ -caprolactone) and β cyclodextrin was synthesized for the first time by a click reaction between ethynyl-end-functionalized saccharides and azido end-functionalized polymers. Progesterone and clobetasol-17-propionate were selected as drug model since these systems were designed to lipophilic drugs.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Progesterone (4-Pregnene-3,20-dione, $\geq 99\%$), clobetasol propionate ($\geq 98\%$), ethanolamine hydrochloride, *N,N,N',N'',N'''*-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA, purity = 99%) and copper (I) bromide (CuBr, purity > 99.999%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mono-6-N-propargylamino-6-deoxy- β CyD (propargyl- β CyD) was synthesized according to a previous report (GUO, Z. et al., 2009). The synthesis of azido end-functionalized poly(ϵ -caprolactone) (PCL_{5k}-N₃: $M_n = 4,890$) and Mal₇-*b*-PCL_{5k} were reported in another study from our research group (OTSUKA, I. et al.,

2012b). Methanol used in the analysis was HPLC grade (Carlo Erba, Milan, Italy) and all other used chemicals were analytical reagent grade.

2.2 Synthesis of β CyD-*b*-PCL_{5k}

Propargyl- β CyD (80 mg, 0.75 mmol) and PMDETA (19 μ L, 0.093 mmol) were added to a flask and dissolved in DMF (5.0 mL). PCL_{5k}-N₃ (0.31 g, 0.062 mmol) and CuBr (13 mg, 0.093 mmol) were added to another flask and dissolved in DMF (5.0 mL). Both mixtures were degassed with argon for 10 min. The mixture of propargyl- β CyD and PMDETA was added into the flask containing PCL_{5k}-N₃ and CuBr under argon atmosphere by cannula transfer. The mixture was stirred at 60 °C for 7 days. After cooling to room temperature, the reaction mixture was passed through a short pad of alumina and eluted with THF. The polymer was purified by reprecipitation using DMF (good solvent) and cold MeOH (poor solvent) to obtain β CyD-*b*-PCL_{5k} as a white solid (0.186 g).

2.2.1 Instruments

¹H NMR spectrum was recorded using a 400 MHz Bruker Avance DRX400 and size exclusion chromatography (SEC) was performed at 40 °C using a Agilent 390 MDS system (290 LC pump injector, ProStar 510 column oven, 390 MDS refractive index detector) equipped with Knauer Smartline UV detector 2500 and two Agilent PolyPore PL1113–6500 columns (linear, 7.5 \times 300 mm; particle size, 5 Gm; exclusion limit, 200–2000000) in DMF containing lithium chloride (0.01 M) at the flow rate of 1.0 mL min⁻¹.

2.3 Preparation of drug- loaded polymeric VPs

The self-assembly of hybrid BCPs in a selective solvent provides a variety of morphologies such as spherical and wormlike VPs, vesicles, and numerous other microstructures owing the equilibrium of the different interactions between the two blocks and the solvent (SMART et al., 2008). Therefore, an appropriate morphological control to obtain monodisperse VPs should be considered.

The polymeric VPs were prepared by microphase inversion technique in water (ZHAO et al., 2001). Firstly, the β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal-*b*-PCL_{5k} block copolymers were separately dissolved in a THF, at a concentration of 370.0 μ g ml⁻¹. The incorporation of drugs into the

bilayer of β CyD-*b*-PCL_{5k} or Mal₇-*b*-PCL_{5k} vesicles was performed by dissolving 50.0 μ g of progesterone or clobetasol propionate in a 1.0 mL each copolymers solution (as previously described). To induce the self-assembly, 0.1 mL of each copolymer solution in THF (good solvent for PCL), containing the drug, was added dropwise to 4.9 mL of highly purified water (good solvent for oligosaccharides) under stirring. The organic solvent was removed using a rotary evaporator under reduced pressure, and the final volume of the colloidal suspension was adjusted to 2.0 mL. The final concentrations of the corresponding block copolymer and drug were 18.5 and 25.0 μ g mL⁻¹, respectively. This polymer/drug ratio was selected since it provided higher encapsulation efficiency (approximately 98%).

2.4 Zeta potential measurements (ζ)

Zeta potential was determined by laser-doppler anemometry using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). NP suspensions were diluted in ultrapure Milli-Q® water and placed in the electrophoretic cell where a potential of ± 150 mV was applied. The ζ potential values were calculated as mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation.

2.5 Dynamic (DLS) and static (SLS) light scattering

Light scattering measurements were performed using an ALV laser goniometer, which consists of a 22 mW HeNe linear polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm, an ALV-5004 multiple τ digital correlator with 125 ns initial sampling time, and a temperature controller. Light scattering measurements data were collected for 0.25 mg mL⁻¹ copolymer samples at 25°C and recorded over 300 s for each angle (ranging from 35° to 140°). For dilute solutions of spherical particles, the Stokes-Einstein equation is adequate to describe the relationship between the hydrodynamic particle size and the diffusion coefficient (D) and it is given as: $R_H = K_B T / (6\pi\eta D)$, where R_H is the hydrodynamic radius, K_B is Boltzmann constant, T is the temperature of the sample, and η is the viscosity of the medium.

The Guinier Plot allows the determination of the radius of gyration (R_g) from the measured scattered intensity $I_s(q)$ as a function of the scattering angle θ by SLS. Using a logarithmic plot of the Guinier equation acquired, $\ln I_{s(q)} = \ln I_i - q^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right)$, one obtains R_g from a simple linear fit. Theoretically calculated values of ρ -ratios are commonly used to examine the morphology of the microstructure of

aggregates for the nanoparticles. It is simply defined as (SCHÄRTL, 2007):

$$\rho = \frac{R_g}{R_H}$$

2.6 Transmission Electron Microscopy (TEM)

The morphology and the size of the polymeric nanoparticles were determinate using transmission electron microscopy (TEM). All samples were observed using a JEOL JEM-1011 microscope operating at an acceleration voltage of 80 kV. The aqueous suspensions (4 µL) were dropped on to the copper grids. Water was allowed to evaporate from the grids at atmospheric pressure and room temperature.

2.7 Encapsulation efficiency (EE)

The entrapment efficiency (%) was estimated as being the difference between the total concentration (C_T) of drug-loaded nanoparticles after their complete dissolution and the concentration of drug in the supernatant (C_s) obtained by a suspension ultrafiltration/centrifugation procedure (4500 rpm for 30 min using Amicon Ultra-0.5 membranes (100 000 nominal MW limit; Millipore).

The C_T was found in specific amount (0.5 mL) of drug-loaded nanoparticles after their dissolution in 0.5 mL of the binary solvent mixture acetone:water (7:3 v/v) and dilution in mobile phase (volume completed to 2.0 mL). Finally, aliquots (20 µL) of these solutions were injected into the HPLC system (see Section 2.8), and the drug content was expressed in µg drug/mL suspension. The equation adequate to EE (%) is given as (GRANADA et al., 2008; GRANADA et al., 2013; NORONHA et al., 2013; CAON et al., 2014):

$$EE (\%) = \frac{C_T - C_s}{C_T} (100)$$

2.8 HPLC analysis

The HPLC system consisted of a Shimadzu (Kyoto, Japan) LC-10A liquid chromatograph equipped with an LC-10AD pump, SPD-10AV variable-wavelength photodiode array (PDA) detector, and SCL-10Avp controller unit, with the sample injection performed via a Rheodyne 7125 valve with a 20 µL loop. The chromatographic

separation was carried out using a RP Phenomenex (Torrance, CA) C18 column (15 cm x 4.6 mm ID, 5 μ m), with a mobile phase composed of methanol and water (84.5-15.5 or 80.0-20.0 v/v for progesterone and clobetasol propionate, respectively) at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was 20 μ L, and both drugs were detected by UV absorption at 240 nm. The column was maintained at 40 \pm 1°C. The validation parameters evaluated were specificity, linearity and range, accuracy, precision, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD). The performance characteristics were based on the pharmaceutical regulatory guidelines of the International Conference on Harmonization (2005).

2.9 Statistical analysis

Data are shown as mean \pm standard deviation, and statistical differences were determined by using one-way ANOVA test and Tukey's test with a significance level of $p < 0.05$. All statistical analysis were performed using GraphPad InStat software (San Diego, USA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

The hybrid diblock copolymer containing β CyD and PCL (β CyD-*b*-PCL_{5k}) was synthesized by Cu(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) of propargyl-functionalized (propargyl- β CyD) with PCL having a terminal azido group (PCL_{5k}-N₃; Mn = 4,890) according to our previous report on Mal₇-*b*-PCL_{5k} (OTSUKA, I. et al., 2012b) (Scheme 1). The signal corresponding to the azido group of PCL_{5k}-N₃ around 2,100 cm⁻¹ disappeared in the IR spectra of the product, indicating that the azido group of PCL-N₃ was completely reacted with alkyne groups of propargyl- β CyD. The SEC trace of the product shown in Fig. 1 clearly shifted toward higher molar mass region as compared to that of PCL-N₃, indicating that the product had efficient conjugation of the β CyD blocks to the PCL block. In addition, the ¹H NMR spectrum of the product showed the signals corresponding to the protons of PCL blocks (Fig. 2, the signals a-e), the methine protons of triazole rings (Fig. 2, the signal f), and protons of β CyD (Fig. 2, the signals g-o). Thus, the obtained product was assigned to β CyD-*b*-PCL_{5k}.

Scheme 1. Synthesis of $\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$.

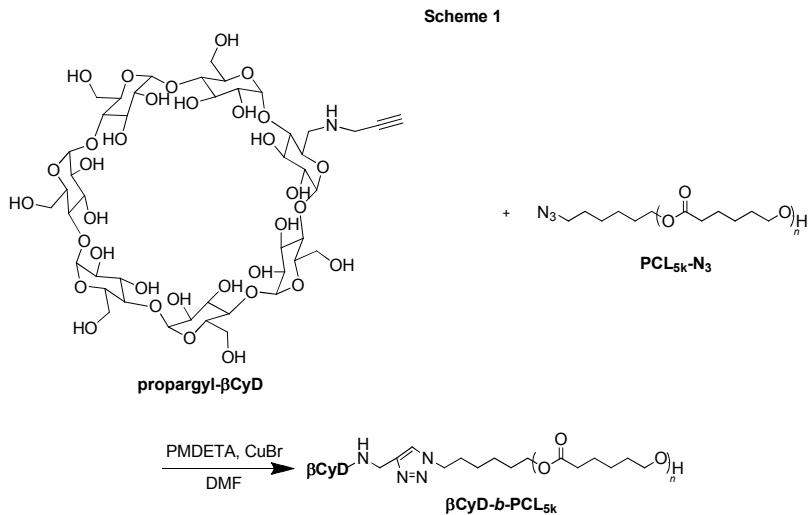


Fig. 1. SEC traces of $\text{PCL}_{5k}\text{-N}_3$ (dotted line), and $\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ (solid line).

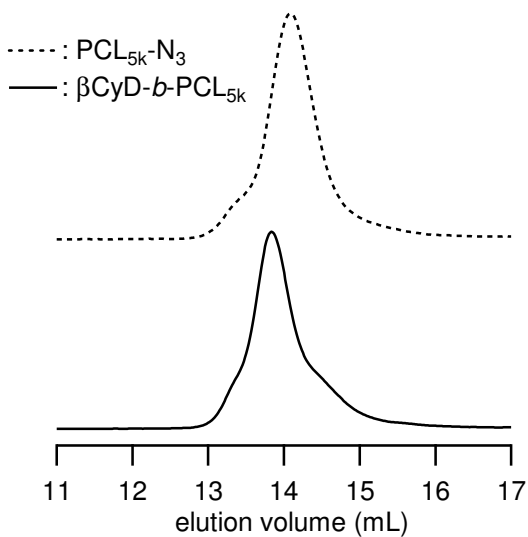
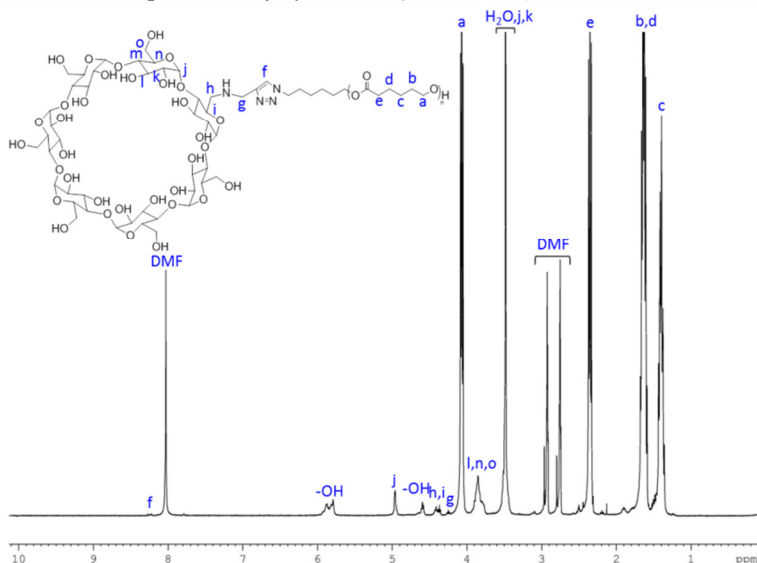


Fig. 2. ^1H NMR spectrum of $\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ in $\text{DMF-}d_7$.



The size and morphology of $\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ and $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ -based aqueous suspensions were studied by light scattering measurements through the autocorrelation functions and decay time distributions. $\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ -based aqueous suspension showed a monomodal particle distribution while $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ -based aqueous suspension showed relatively dispersed size distributions at the scattering angle of 90° (Fig. 3). The R_H values of the $\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ and $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ self-assembling in water were calculated to be 72 and 34 nm, respectively (Fig. 4).

Fig. 3. (a) Correlation functions and decay time distribution obtained at the scattering angle 90° for β CyD-*b*-PCL_{5k} aqueous suspension, at concentration of $1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (conditions: scattering angle, $\theta = 90^\circ$; temperature, 25°C).

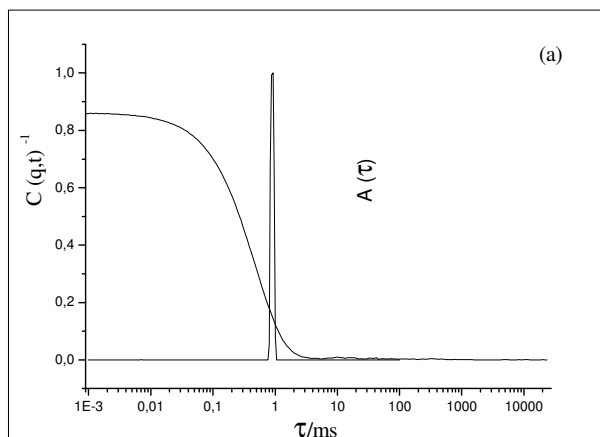


Fig. 3. (b) Correlation functions and decay time distribution obtained at the scattering angle 90° for Mal₇-*b*-PCL_{5k} aqueous suspension, at concentration of $1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (conditions: scattering angle, $\theta = 90^\circ$; temperature, 25°C).

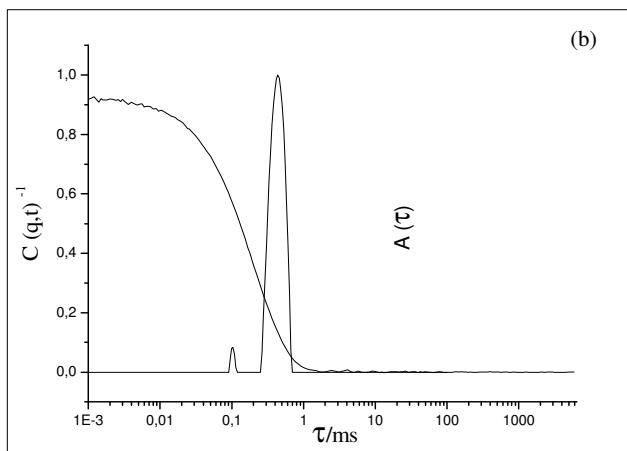


Fig. 4. (a) Variation of the relaxation frequency (Γ) vs the square of the (q^2) wave vector of (A) β CyD-*b*-PCL_{5k} aqueous suspension.

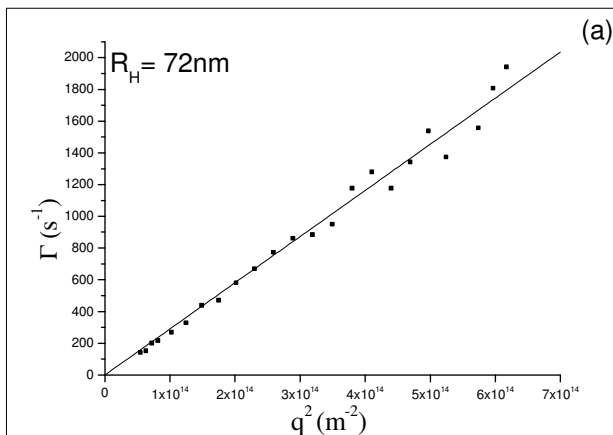
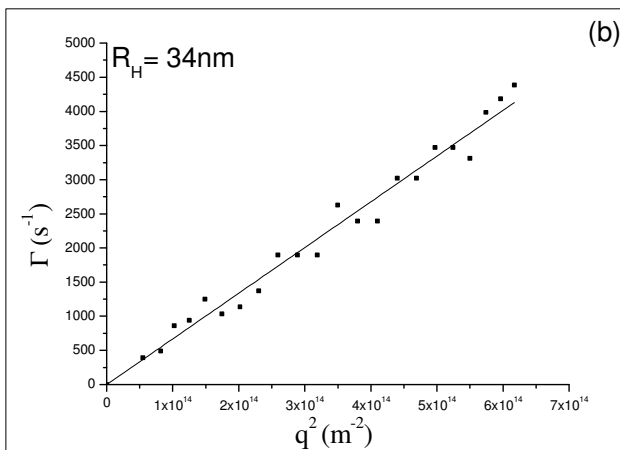


Fig. 4. (b) Variation of the relaxation frequency (Γ) vs the square of the (q^2) wave vector of Mal₇-*b*-PCL_{5k} aqueous suspension.



The R_g (Guinier plot) from static light scattering (SLS) were 66 and 40 nm for β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal₇-*b*-PCL_{5k} aqueous suspensions (Fig. 5), respectively. The combination of the particle size

characteristics determined from static (R_g) and dynamic (R_H) light scattering measurements, so-called ρ -ratio, provides an important indication of the scattering particle morphology, especially when small particles (10–100 nm) are considered (SCHÄRTL, 2007). The ρ -ratio values of β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal7-*b*-PCL_{5k}-based nanoparticles were 0.91 and 1.17, respectively. Given that the theoretical values of ρ -ratio for solid spherical and vesicular particles are 0.775 and 1.0, respectively (BURCHARD; PATTERSON, 1983); the results indicate that both types of amphiphilic BCPs are able to form vesicular particles in water.

Fig. 5. (a) Guinier plots calculated from the elastic light scattering intensity of β CyD-*b*-PCL_{5k} aqueous suspension (conditions: 1.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; temperature, 25 °C).

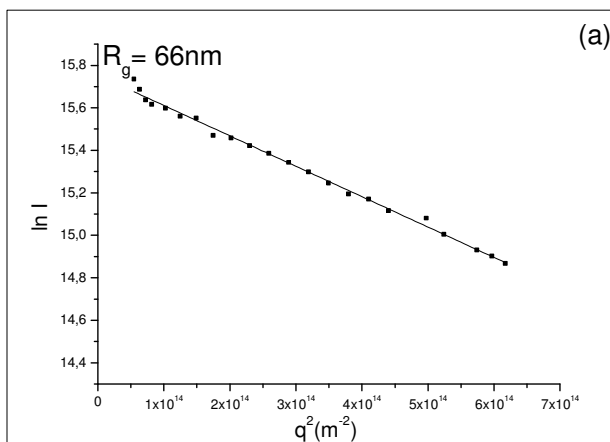
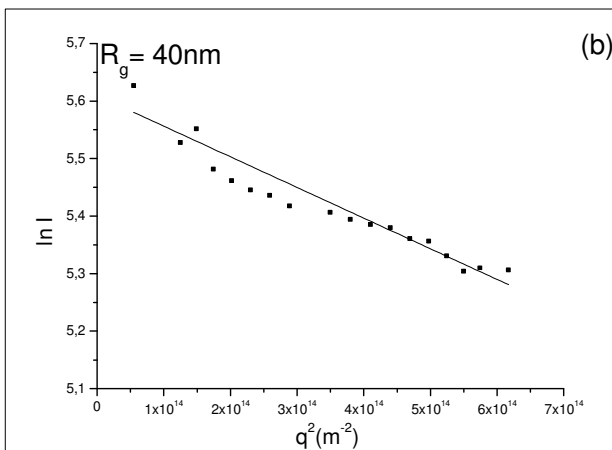
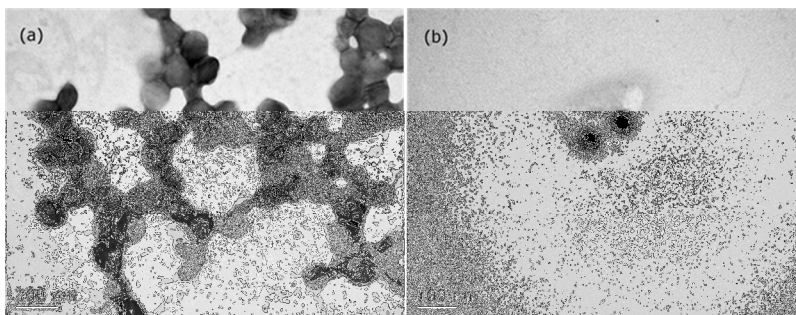


Fig. 5. (b) Guinier plots calculated from the elastic light scattering intensity of Mal7-*b*-PCL_{5k} aqueous suspension (conditions: 1.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; temperature, 25 $^{\circ}\text{C}$).



TEM (Fig. 6) analysis was carried out in order to confirm the light scattering results. The morphological structures have been observed and the particle diameter values obtained by TEM were similar those obtained through the DLS technique.

Fig. 6. TEM images of (a) unloaded- $\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ VPs and (b) unloaded-Mal7-*b*-PCL_{5k} VPs.



DLS measurements on $\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ -based VPs loaded with progesterone or clobetasol propionate showed a R_H of 70.4 and 85.0 nm, respectively; while Mal7-*b*-PCL_{5k}-based VPs loaded with progesterone

or clobetasol propionate showed R_H of 59.7 and 50.2 nm, respectively. The drug loading in vesicles BCPs lead to significant changes in particle size compared to drug-free vesicles (Fig. 4 vs. Fig. 7) for the β CyD-*b*-PCL_{5k}-based VPs loaded with clobetasol-17-propionate and Mal₇-*b*-PCL_{5k}-based VPs loaded with both drugs ($p < 0.05$). In the case of the β CyD-*b*-PCL_{5k}-based VPs loaded with progesterone, the addition of this drug did not affects the particle size significantly ($p > 0.05$). Given that progesterone ($\log P = 3.87$) (HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995) is more lipophilic than clobetasol-17-propionate ($\log P = 3.5$) (SANGSTER, 1997) (Fig. 8), it is suggested that the progesterone has been included into the hydrophobic side chain of CDs. It is well-known that CDs are cyclic oligosaccharides with a hydrophilic outer surface and a hydrophobic inner cavity (SAENGER et al., 1998). As such, they can interact with molecules of small size to form total inclusion complexes, or with macromolecular drugs to form partial inclusion complexes through their hydrophobic side chains (AACHMANN et al., 2003; MAHMOUD et al., 2011).

Fig. 7. Autocorrelation functions and decay time distributions measured at scattering angle 90° , as revealed by Contin analysis plot, for (a) Progesterone-loaded- β CyD-*b*-PCL_{5k} VPs, (b) Clobetasol propionate-loaded- β CyD-*b*-PCL_{5k} VPs, (c) Progesterone-loaded- Mal₇-*b*-PCL_{5k} VPs and (d) Clobetasol-17-propionate-loaded-Mal₇-*b*-PCL_{5k} VPs.

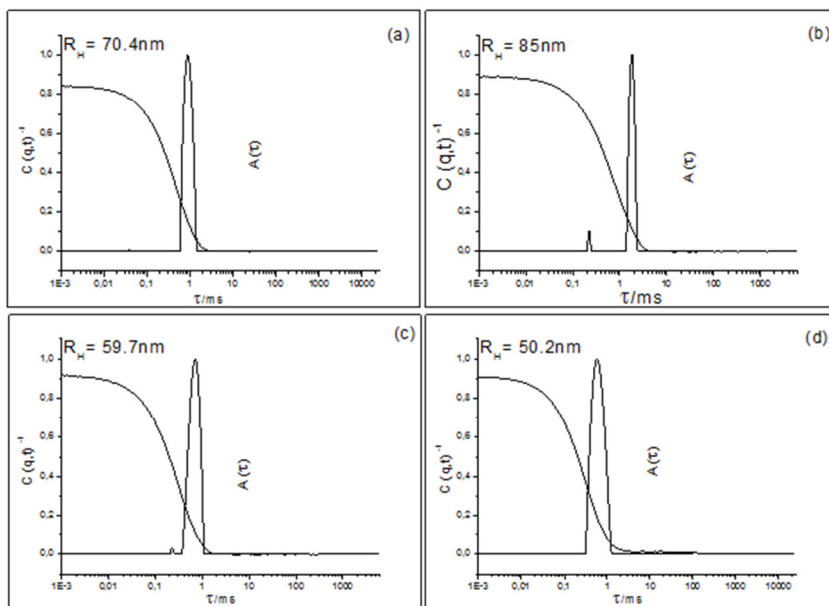
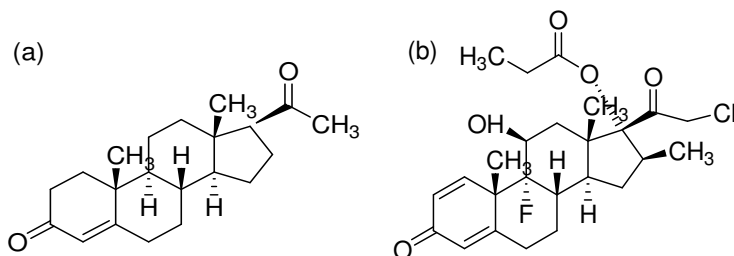


Fig. 8: Chemical structure of (a) Progesterone and (b) Propionate clobetasol.



The HPLC method was validated for specificity, linearity, accuracy, and precision according to international guidelines for its intended use. This method was specific because no interference of formulation was

observed. The calibration curve for progesterone was linear over the range of 2.0-25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a correlation coefficient of $r^2 = 1$. The regression equation of the media calibration curve was $y = 58612x - 20278$. The efficacy of the assay was verified by analysis of variance, which confirmed that the regression equation was linear, ANOVA ($F_{\text{calculated}} = 62671.2 > F_{\text{critical}} = 1.40554 \times 10^{-7}$; $P = 5\%$). The linearity of detector response was assessed for various standard solutions of clobetasol-17-propionate over the range of 2.0-25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The value of the determination coefficient calculated ($r^2 = 1$, $y = 39294x - 13546$; where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicates the linearity of the calibration curve for the method. The effectiveness of the assay was verified by analysis of variance ($F_{\text{calculated}} = 61541.9 > F_{\text{critical}} = 1.4444 \times 10^{-7}$; $P = 5\%$).

VPs presented a drug content ranging between 19.2 and 23.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and encapsulation efficient values higher than 96 % (Table 1), demonstrating their suitability as delivery systems for lipophilic drugs. The high entrapment efficiency values suggest a greater affinity of clobetasol-17-propionate and progesterone for the core of VPs. The LOQ calculated from clobetasol-17-propionate and progesterone curve were 0.55 and 0.135 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Table 1. Drug content, entrapment efficiency and zeta potential of VPs.

Drug-loaded-vesicles	Drug content ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Entrapment Efficiency (%)	Zeta potential (mV)
$\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ loaded-progesterone	19.2	96.2	-11.1
$\beta\text{CyD-}b\text{-PCL}_{5k}$ loaded-clobetasol-17-propionate	23.8	99.2	-9.8
$\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ loaded-progesterone	20.5	99.0	-10.8
$\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ – loaded-clobetasol-17-propionate	22.6	98.7	-9.0

Ideally, drug delivery systems should present high drug loading capacity and high stability. The physical and chemical stability of the VPs is favored by electrostatic repulsion and steric effects, which prevents aggregation caused by occasional collisions (ZANETTI-RAMOS et al., 2008). In our studied systems, the zeta potential values of progesterone and clobetasol-17-propionate loaded VPs based on β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal₇-*b*-PCL_{5k} were, as expected, close to the neutrality, suggesting that the stability of the vesicles is more related to steric effects. Given that the drug is present during the self-assembly process, the drug would enclosure into the hydrophobic block of copolymer leading to greater exposure the hydrophilic shell, which is negatively charged due to hydroxyl groups of oligosaccharides.

4 CONCLUSION

Polymeric VPs loaded with progesterone or clobetasol propionate were successfully prepared by microphase inversion technique. Both types of amphiphilic BCPs are able to form vesicular particles in water. The stability of the nanoparticles was caused by steric effects of the oligosaccharides surface. All nanoparticles showed high drug loading efficiency (higher than 96 %), confirming their suitability as delivery system for lipophilic drugs.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from CNRS and CAPES (CAPES-COFECUB Grant N° 620/08) and the Federal University of Santa Catarina (UFSC). The authors are grateful for the help of Jean-Luc Putaux in the technical assistance with scanning electron, and Christophe Travelet for light scattering experiments.

5 REFERÊNCIAS

AACHMANN, F. L.; OTZEN, D. E.; LARSEN, K. L.; WIMMER, R. Structural background of cyclodextrin-protein interactions. **Protein Engineering**, v. 16, n. 12, p. 905-912, 2003.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 16, n. 1-4, p. 3-27, 1999.

AMMAR, H. O.; EL-NAHHAS, S. A.; GHORAB, M. M.; SALAMA, A. H. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as drug delivery system. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 127-136, 2012.

AMMAR, H. O., EL-NAHHAS, S. A., GHORAB, M. M., SALAMA, A. H. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as drug delivery system. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 72, n., p., 2012.

ARCHONTAKI, H. A.; VERTZONI, M. V.; ATHANASSIOU-MALAKI, M. H. Study on the inclusion complexes of bromazepam with beta- and beta-hydroxypropyl-cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 3-4, p. 761-769, 2002.

BETTINETTI, G. R.; MURA, R.; MELANI, F.; RILLOSI, M.; GIORDANO, F. Interactions Between Naproxen and Maltoheptaose, the Non-Cyclic Analog of β -Cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry**, v. 25, n., p. 327-338, 1996.

BURCHARD, W.; PATTERSON, G. D. **Light Scattering from Polymers** secondary title: Springer Berlin Heidelberg, v.48, 1983.

BURCHARD, W. Structure formation by polysaccharides in concentrated solution. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 342-353, 2001.

CAON, T.; PORTO, L. C.; GRANADA, A.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A.; SIMOES, C. M.; BORSALI, R.; SOLDI, V. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 165-172, 2014.

CARLSEN, A.; LECOMMANDOUX, S. Self-assembly of polypeptide-based block copolymer amphiphiles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 329-339, 2009.

DALMORA, M. E.; DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, n. 1, p. 45-55, 2001.

DUMITRIU, S. **Polysaccharides as biomaterials**. New York Marcel Dekker, 2001.

GRANADA, A.; MURAKAMI, F. S.; SARTORI, T.; LEMOS-SENNA, E.; SILVA, M. A. Development and validation of an HPLC method to quantify camptothecin in polymeric nanocapsule suspensions. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 3, p. 551-556, 2008.

GRANADA, A.; TAGLIARI, M. P.; SOLDI, V.; SILVA, M. A.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; FERNANDES, D.; STULZER, H. K. Nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: validation of a stability-indicating HPLC method to evaluate the drug entrapment efficiency and in vitro release profiles. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 2, p. 276-281, 2013.

GUO, Y. L.; CUI, Z. S.; HAN, M. Synthesis, Micellization and Characterization of Novel Amphiphilic beta-Cyclodextrin/Poly(L-aspartate) Copolymer. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 29, n. 3, p. 603-606, 2013.

GUO, Z.; JIN, Y.; LIANG, T.; LIU, Y.; XU, Q.; LIANG, X.; LEI, A. Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic

interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a "Click beta-cyclodextrin" stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 2, p. 257-263, 2009.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. Exploring QSAR, Hydrophobic, Electronic and Steric constants. In: (Ed.). **American Chemical Society**. Washington, DC. USA, , 1995.

HE, Y.; FU, P.; SHEN, X.; GAO, H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. **Micron**, v. 39, n. 5, p. 495-516, 2008.

ISONO, T.; OTSUKA, I.; SUEMASA, D.; ROCHAS, C.; SATOH, T.; BORSALI, R.; KAKUCHI, T. Synthesis, Self-Assembly, and Thermal Caramelization of Maltoheptaose-Conjugated Polycaprolactones Leading to Spherical, Cylindrical, and Lamellar Morphologies. **Macromolecules**, v. 46, n. 22, p. 8932-8940, 2013.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 327-341, 2004.

LIU, T. B.; ZHOU, Z. K.; WU, C. H.; NACE, V. M.; CHU, B. Effects of block lengths on the association numbers and micellar sizes of BnEmBn type triblock copolymer micelles in aqueous solution. **Macromolecules**, v. 30, n. 24, p. 7624-7626, 1997.

MAHMOUD, A. A.; EL-FEKY, G. S.; KAMEL, R.; AWAD, G. E. Chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 229-236, 2011.

MAZZARINO, L.; OTSUKA, I.; HALILA, S.; BUBNIAK, L. D.; MAZZUCCO, S.; SANTOS-SILVA, M. C.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R. Xyloglucan-block-Poly(epsilon-Caprolactone)

Copolymer Nanoparticles Coated with Chitosan as Biocompatible Mucoadhesive Drug Delivery System. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 5, p. 709-719, 2014.

NORONHA, C. N.; GRANADA, A. F.; CARVALHO, S. M.; LINO, R. C.; MACIEL, V. O. B.; BARRETO, P. L. M. Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops & Products**, v. 50, n., p. 896-903, 2013.

O'REILLY, R. K. Spherical polymer micelles: nanosized reaction vessels? **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 365, n. 1861, p. 2863-2878, 2007.

OTSUKA, I.; FUCHISE, K.; HALILA, S.; FORT, S.; AISSOU, K.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; CHEN, Y.; NARUMI, A.; KAKUCHI, T.; BORSALI, R. Thermoresponsive vesicular morphologies obtained by self-assemblies of hybrid oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer systems. . **Langmuir**, v. 26, n. 4, p. 2325-2332, 2010.

OTSUKA, I.; ISONO, T.; ROCHAS, C.; HALILA, S.; FORT, S.; SATOH, T.; KAKUCHI, T.; BORSALI, R. 10 nm Scale Cylinder-Cubic Phase Transition Induced by Caramelization in Sugar-Based Block Copolymers. **ACS Macro Letters**, v. 1, n. 12, p. 1379-1382, 2012a.

OTSUKA, I.; TRAVELET, C.; HALILA, S.; FORT, S.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; NARUMI, A.; BORSALI, R. Thermoresponsive self-assemblies of cyclic and branched oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) diblock copolymers into nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 5, p. 1458-1465, 2012b.

OTSUKA, I.; OSAKA, M.; SAKAI, Y.; TRAVELET, C.; PUTAUX, J. L.; BORSALI, R. Self-assembly of maltoheptaose-block-polystyrene into micellar nanoparticles and encapsulation of gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 29, n. 49, p. 15224-15230, 2013a.

OTSUKA, I.; TALLEGAS, S.; SAKAI, Y.; ROCHAS, C.; HALILA, S.; FORT, S.; BSIESY, A.; BARON, T.; BORSALI, R. Control of 10 nm scale cylinder orientation in self-organized sugar-based block copolymer thin films. **Nanoscale**, v. 5, n. 7, p. 2637-2641, 2013b.

QUAGLIA, F.; OSTACOLO, L.; NESE, G.; CANCELLLO, M.; DE ROSA, G.; UNGARO, F.; PALUMBO, R.; LA ROTONDA, M. I.; MAGLIO, G. Micelles based on amphiphilic PCL-PEO triblock and star-shaped diblock copolymers: Potential in drug delivery applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 87A, n. 3, p. 563-574, 2008.

SAENGER, W. R.; JACOB, J.; GESSLER, K.; STEINER, T.; HOFFMANN, D.; SANBE, H.; KOIZUMI, K.; SMITH, S. M.; TAKAHA, T. Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues - Beyond the doughnut. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1787-1802, 1998.

SANGSTER, J. **Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry**. Wiley, New York, 1997

SCHÄRTL, W. Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions. **Springer Laboratory Manuals in Polymer Science** 2007.

SMART, T.; LOMAS, H.; MASSIGNANI, M.; FLORES-MERINO, M. V.; PEREZ, L. R.; BATTAGLIA, G. Block copolymer nanostructures. **Nanotoday**, v. 3, n. 3-4, p. 38-36, 2008.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug fomulation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 900-915, 2004.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug fomulation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n., p., 2004.

WEBBER, S. E. Polymer micelles: An example of self-assembling polymers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 15, p. 2618-2626, 1998.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; LEMOS-SENNA, E.; CRAMAIL, H.; CLOUTET, E.; BORSALI, R.; SOLDI, V. The role of surfactant in the miniemulsion polymerization of biodegradable polyurethane

nanoparticles. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 28, n. 4, p. 526-531, 2008.

ZHAO, Y.; LIANG, H. J.; WANG, S. G.; WU, C. Self-assembly of poly(caprolactone-b-ethylene oxide-b-caprolactone) via a microphase inversion in water. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 4, p. 848-851, 2001.

CAPÍTULO 3
ARTIGO 2 – IMPROVED QUANTIFICATION OF THE
DRUG-LOADED NANOPARTICLES BY APPLYING STATIC
LIGHT SCATTERING PRIOR TO HPLC ANALYSIS

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

O doseamento do teor de fármaco dentro das vesículas pela técnica de CLAE é relatado nesse capítulo em forma de artigo científico. Neste artigo está descrito o estudo de cadeia simples dos copolímeros a partir do espalhamento de luz estático (SLS) para determinação da mistura binária de solventes utilizada na quantificação do teor de fármaco bem como na eficiência de encapsulação das VPs pela técnica de CLAE. Neste contexto, destaca-se a necessidade de determinar a mistura binária de solventes que melhor solubilize as VPs obtidas a partir dos copolímeros em bloco $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ e $\beta\text{CD-}b\text{-PCL}_{5k}$ para que haja a liberação do fármaco presente dentro das vesículas na solução que deverá ser quantificada por CLAE de forma indireta pela técnica de ultracentrifugação-centrifugação.

Technical communications

Improved quantification of the drug-loaded nanoparticles by applying static light scattering prior to HPLC analysis

Andrea Granada^b, Christophe Travelet^a, Issei Otsuka^a, Marcos Antonio Segatto Silva^b, Corinne Ravelet^c, Valdir Soldi^{d,*} and Redouane Borsali^a

^a Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV – CNRS UPR 5301), affiliated with Université de Grenoble-Alpes, member of the Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG – CNRS FR 2607), of the PolyNat Carnot Institute and of the Arcane LabEx, Domaine Universitaire de Grenoble, 601 rue de la Chimie, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

^b Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^c Univ. Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France
CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

^d Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

* Corresponding Author: Valdir Soldi

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900, Florianópolis – SC, Brasil.
E-mail: soldi.valdir@gmail.com

ABSTRACT

Entrapment efficiency of progesterone and clobetasol propionate in polymeric vesicles (VPs) based on β cyclodextrin-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (β CyD-*b*-PCL) and maltoheptaose₇-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (Mal₇-*b*-PCL) block copolymers was determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). Static light scattering (SLS) was used to choose the ideal binary solvent mixture to quantify the drug content for both copolymer systems. The mixture of acetone and water (7:3 v/v) ensured the total drug release from VPs (β CyD-*b*-PCL and Mal₇-*b*-PCL). The interference with oligosaccharide groups was not encountered only for this solvent mixture at 240 nm by HPLC method. A specific, linear, accurate and precise HPLC method was developed and validated.

Keywords: Static light scattering, Polymeric nanoparticles, Hybrid block copolymers, Liquid chromatography

1 INTRODUCTION

Block copolymers (BCPs) have received great attention for pharmaceutical applications. They enhance the solubilization of hydrophobic pharmaceuticals. Their hydrophobic core provides a suitable microenvironment for the incorporation of water-insoluble drugs while the hydrophilic shell imparts steric stabilization (KATAOKA; HARADA; NAGASAKI, 2001). The self-assembly of BCPs is often spontaneous and can be performed in the presence of small molecules, resulting in encapsulated drugs inside polymeric vesicles (VPs) with diameters up to hundreds of nanometers. Since the drug is present during the self-assembly process, the self-assemblies are thus loaded (RUGHANI; SCHNEIDER, 2008; CAON et al., 2014).

Amphiphilic BCPs formed by an oligosaccharide and a synthetic block are able to self-assemble in aqueous solution in micellar structures whose shell is the oligosaccharide block and core the synthetic block. Recently, several studies dealing with the development of block copolymers containing oligo- or polysaccharides have been accomplished (OTSUKA et al., 2012a; MAZZARINO et al., 2014).

Previously, novel VPs based on β -cyclodextrin-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (β CyD-*b*-PCL_{5K}) and maltoheptaose₇-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (Mal₇-*b*-PCL_{5K}) block copolymers have been developed by our research team (GRANADA et al., submission process; ISONO et al., 2013). These copolymer systems have been explored for the first time as drug delivery systems and showed high capacity to load lipophilic drugs such as progesterone and clobetasol propionate (GRANADA et al., submission process). In general, published methods to determine VPs drug loading use liquid chromatography with either UV or fluorescence detection (GRANADA et al., 2008; DO NASCIMENTO et al., 2012; GRANADA et al., 2013). However, when quantifying the drug using liquid chromatography, interferences have been encountered with oligosaccharide groups of BCPs. It is important to highlight that methods using UV/VIS spectrophotometer are not ideal to determine the absence of interference between the formulation excipients which take part in the polymeric VPs and the oligosaccharide groups of BCPs.

The BCP single chain study was performed by static light scattering (SLS) to define the proper solvent mixture to develop and

validate a specific, linear, accurate and precise reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method. In this direction, the research on diblock copolymer/solvent systems using different proportions of binary solvent mixtures was performed.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Progesterone (4-pregnene-3,20-dione, $\geq 99\%$) and clobetasol-17-propionate ($\geq 98\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Diblock copolymer containing maltoheptaose (Mal₇) or β -cyclodextrin (β CyD) as oligosaccharidic block and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) were synthesized according to a methodology previously reported by our research team (ISONO et al., 2013; TAKUYA et al., 2013). Methanol used in the analysis was HPLC grade (Carlo Erba, Milan, Italy) and all other used chemicals were analytical reagent grade.

2.2 Preparation of copolymer samples

The copolymer solutions of β CyD-*b*-PCL and Mal₇-*b*-PCL, at a concentration of $11.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, were prepared at different proportions of binary solvent mixtures such as acetone, tetrahydrofuran (THF), dioxane and water. The binary solvent mixtures were prepared ranging from 100% organic solvent to 100% water.

2.3 Preparation of polymeric VPs

The polymeric VPs were prepared by microphase inversion technique (ZHAO et al., 2001). The β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal₇-*b*-PCL_{5k} block copolymers were dissolved in THF at a concentration of $370.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. The incorporation of drugs into the bilayer of β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal₇-*b*-PCL_{5k} VPs was performed as follows: dissolving $50.0 \mu\text{g}$ of the corresponding model drug (progesterone and clobetasol propionate) in $0.1 \mu\text{L}$ each copolymer solution, previously made. To induce the self-assembly, $0.1 \mu\text{L}$ of each copolymer solution in THF (a good solvent for PCL), containing the lipophilic model drug, was added dropwise to 4.9 mL of highly purified water (a good solvent for oligosaccharides) with stirring. The organic solvent was removed using a rotary evaporator under reduced pressure, and the final volume of the colloidal suspension was adjusted to 2.0 mL . The final concentrations of the corresponding

block copolymer and drug were 22.0 and 25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. This polymer/drug ratio was selected since it provided higher encapsulation efficiency (approximately 90%).

2.4 Static light scattering (SLS)

SLS measurements were performed using an ALV laser goniometer, which consists of a 22 mW HeNe linear polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm, an ALV-5004 multiple τ digital correlator with 125 ns initial sampling time, and a temperature controller. SLS data were collected for 11.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ samples at 25 °C and recorded over 100 s at a scattering angle of 90°.

2.5 Reversed-phase high-performance liquid chromatography

The HPLC system consisted of a Shimadzu (Kyoto, Japan) LC-10A liquid chromatograph equipped with a LC-10AD pump, a SPD-10AV variable-wavelength photodiode array (PDA) detector, and a SCL-10Avp controller unit, with the sample injection performed *via* a Rheodyne 7125 valve with a 20 μL loop. The chromatographic separation was carried out using a RP Phenomenex (Torrance, CA, USA) C18 column (15 cm \times 4.6 mm ID, 5 μm), with as mobile phase methanol and water in proportions of 84.5-15.5 (v/v) for progesterone and 80.0-20.0 (v/v) for clobetasol-17-propionate at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . The injection volume was 20 μL , and both drugs were detected by UV absorption at 240 nm. The column was maintained at 40 ± 1 °C. Data acquisition was performed using the Shimadzu Class-VP V 6.14 software program by measurement of detection peak areas.

Method validation: The method to quantify progesterone and clobetasol propionate into the polymeric VPs was validated through determination of the following parameters according to International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2 (R1): specificity, linearity and range, accuracy, precision, LOQ, LOD and robustness.

2.6 Drug entrapment efficiency

Entrapment efficiency and drug content in the polymeric VPs were determined using the developed HPLC method. The entrapment efficiency (%) was estimated by measuring the difference between the total amount of drug loaded within the polymeric nanoparticles and the

amount of non-loaded drug remaining in the filtrate (acceptor phase) after an ultrafiltration/centrifugation procedure at 4500 rpm for 30 min using Amicon Ultra-0.5 membranes (nominal molecular weight limit = 100000 g mol⁻¹; Millipore, USA). The total concentration of drugs was determined using a specific amount (0.5 mL) of drug loaded VPs after their complete dissolution in 0.5 mL of the binary solvent mixtures (acetone:water) and dilution in the mobile phase (volume completed to 2.0 mL). Finally, aliquots (20 µL) of these solutions were injected into the HPLC system (see section 2.5), and the drug content was expressed in µg drug mL⁻¹ suspension.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The validation results confirmed that the developed method is specific, linear, accurate and precise for its intended use.

In order to measure the specificity of the method, the absence of interference between the excipients and the VPs suspensions (free-drug nanoparticles) must be checked. In this study, the VPs were prepared without excipient in the formulation. However, the interference of BCP oligosaccharide groups can be observed under the chromatographic conditions employed. In general, methanol is used to open VPs systems for quantification of the drug (SHIM et al., 2004). Nevertheless, methanol and other solvents may cause precipitation of polymers what prevents from total releasing of the drug.

As shown by HPLC, interference was not encountered between the copolymers and the drugs for the binary mixture of acetone and water, in HPLC conditions (Figures 1 and 2). SLS was applied to select the optimal composition of the solvent binary mixture in order to determine the drug content within the VPs and corresponding entrapment efficiency, which is appropriate for the total drug release and prevents the presence of precipitate. Light scattering measurements were performed on diblock copolymer/solvent systems in different proportion of solvents. The optimal solvent binary mixture to solubilize block copolymers and release drugs from VPs based on β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal₇-*b*-PCL_{5k} was acetone:water over the proportion of 7:3 (v/v). In Figure 3, the system becomes in better solvent conditions with increasing acetone content when a plateau is reached from 70 %. A similar behavior is shown in Figure 4, where intermediate acetone contents lead to an aggregative behavior of the whole system.

The chromatograms obtained for progesterone and block copolymers (Fig.1.), and clobetasol-17-propionate and block copolymers (Fig. 2.).

Fig.1. Representative chromatograms obtained in validation studies: (A) unloaded- β CyD-*b*-PCL_{5k} VPs, (B) unloaded-Mal7-*b*-PCL_{5k} VPs and (C) progesterone at 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in solution of acetone and water.

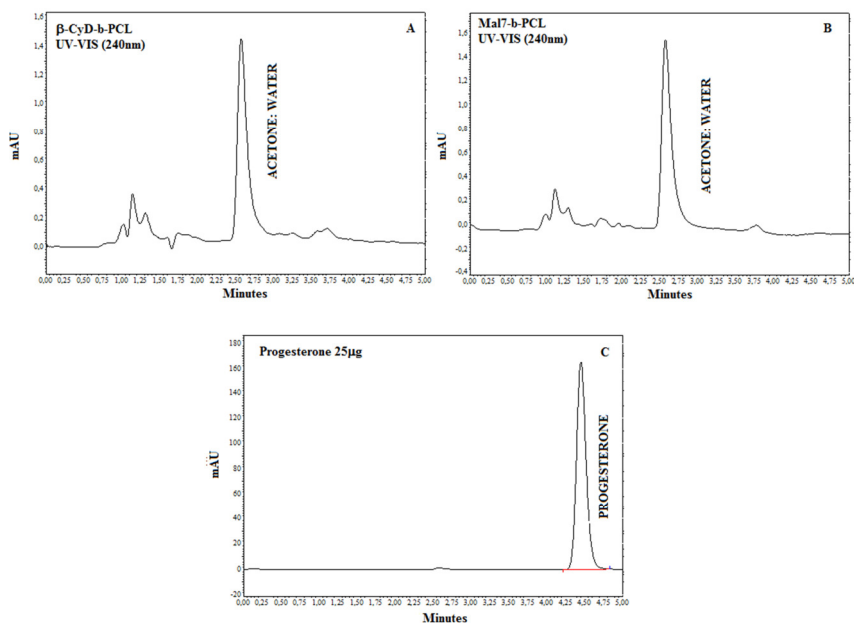
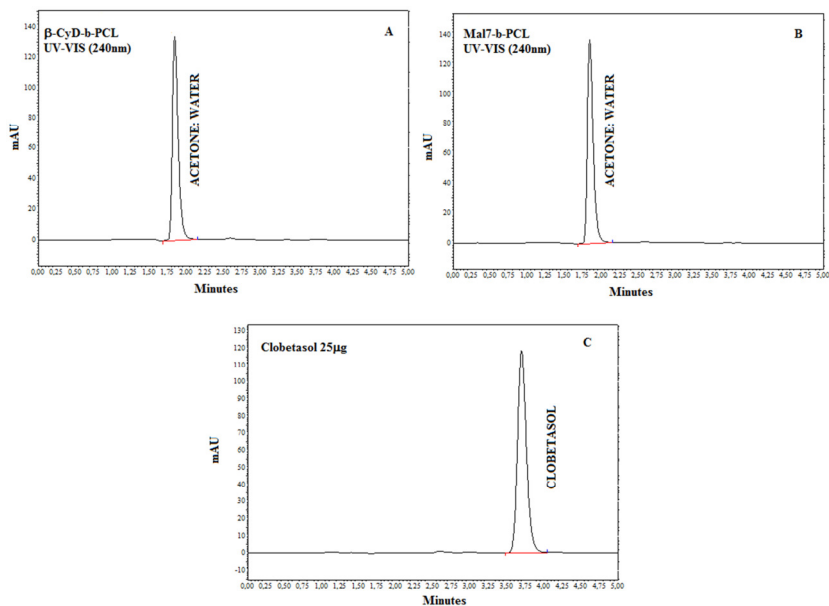
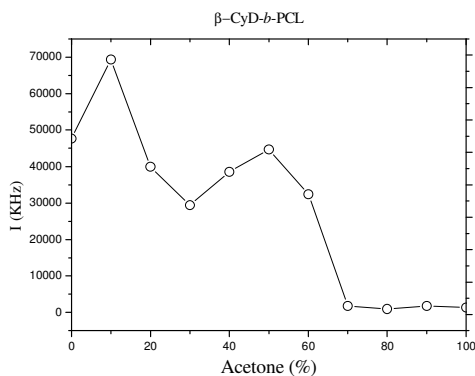


Fig.2. Representative chromatograms obtained in validation studies: (A) unloaded- β CyD-*b*-PCL_{5k} VPs, (B) unloaded-Mal7-*b*-PCL_{5k} VPs and (C) clobetasol propionate at 25 μ g mL⁻¹ in solution of acetone and water.



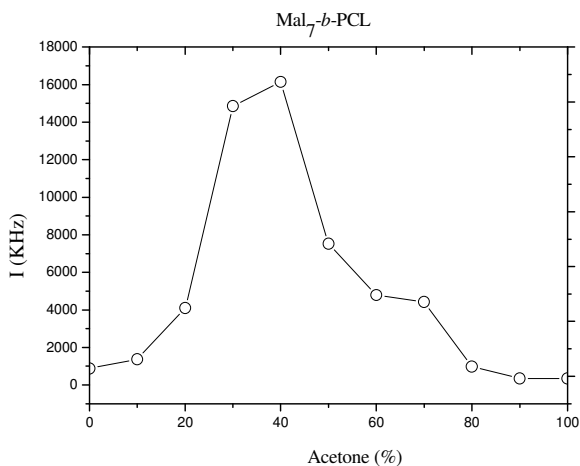
The β CyD-*b*-PCL_{5k} copolymer/solvents system [acetone:water] can be found in Fig.3.

Fig.3. SLS of β CyD-*b*-PCL_{5k} copolymer/solvents system [acetone:water]. Scattering intensity (kHz) was represented by circle symbol.



The Mal₇-*b*-PCL_{5k} copolymer/solvents system [acetone:water] is observed in Fig.4.

Fig.4. SLS of Mal₇-*b*-PCL_{5k} copolymer/solvents system [acetone:water]. Scattering intensity (kHz) was represented by circle symbol.



The linearity of detector response was assessed for various standard solutions of clobetasol-17-propionate over the range of 2.0-25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The value of the determination coefficient calculated ($r^2 = 1$, $y = 39294x - 13546$; where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicates the linearity of the calibration curve for the method. The effectiveness of the assay was verified by analysis of variance, ANOVA ($F_{\text{calculated}} = 61541.9 > F_{\text{critical}} = 1.4444 \times 10^{-7}$; $P = 5\%$). The calibration curve for progesterone was linear over the range of 2.0-25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a correlation coefficient of $r^2 = 1$. The regression equation of the media calibration curve was $y = 58612x - 20278$. The efficacy of the assay was verified by analysis of variance, which confirmed that the regression equation was linear ($F_{\text{calculated}} = 62671.2 > F_{\text{critical}} = 1.40554 \times 10^{-7}$; $P = 5\%$).

The limits of detection and quantitation were also evaluated. The limit of detection was deemed to be where the signal-to-noise ratio was 3:1. The limit of quantitation was defined as the lowest concentration that could be determined with acceptable accuracy and precision which resulted in a peak area twice the detection limit. The LOQ calculated from clobetasol-17-propionate and progesterone curve were 0.55 and 0.135 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These results indicate the high sensitivity of the method.

The accuracy of the method was determined by investigating the recovery of drug at three concentrations using the free-drug polymeric VPs ($\beta\text{CyD-b-PCL}_{5k}$ and $\text{Mal}_7\text{-b-PCL}_{5k}$). No significant differences were observed between amounts of drug added (progesterone and clobetasol-17-propionate) and the amounts found ($P < 0.05$). Mean recovery of drugs standard for low, medium and high level were satisfying the acceptance criteria for the study. The repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) of the method were evaluated by assaying VPs suspension samples based on $\beta\text{CyD-b-PCL}_{5k}$ and $\text{Mal}_7\text{-b-PCL}_{5k}$ with the same concentration of drug (5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The repeatability was evaluated by injecting six samples of each VPs suspension on the same day, under the same experimental conditions. Intermediate precision was evaluated by assaying three sample solutions on three different days. All the data for both copolymers are within the acceptance criteria of 2.0 %, which indicates acceptable precision. The amounts of drugs found on the analysis were equivalent ($P < 0.05$). The results and the experimental range of the variables evaluated in the robustness assessment resulted in small

changes in the retention time without effect on the determination of the drug in the developed VPs.

Studies performed by our research team have demonstrated that the monodisperse populations of particles using β CyD-*b*-PCL_{5k} and Mal₇-*b*-PCL_{5k} copolymers were obtained with high drug loading. The results acquired for drug entrapment and drug content are shown in Table 1.

Table 1. Drug content and entrapment efficiency of VPs.

VP suspensions	Drug content, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Entrapment efficiency, %
Progesterone-loaded- β -CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} VPs	19.2	98.2
Progesterone-loaded- Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} VPs	20.5	99.0
Clobetasol-loaded- β -CyD- <i>b</i> -PCL _{5k} VPs	23.8	99.2
Clobetasol-loaded- Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k} VPs	22.6	98.7

The SLS research on diblock copolymer/solvent systems provided to use the solvent mixtures ensured that the overall release of the drug from VPs, and the absence of interference were guaranteed. The validation results confirmed that the HPLC method is appropriate for its intended purpose.

4 CONCLUSION

Analytical method to quantify both drugs (progesterone and clobetasol propionate) in hybrid BCP VPs was developed and validated. The proposed SLS to appoint the ideal binary solvent mixture for these formulations showed effective. The HPLC method was validated in terms of specificity, linearity, accuracy, precision, and robustness. Consequently, the method was able to quantify the drug content and entrapment efficiency for polymeric VPs.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from CNRS, CAPES (CAPES-COFECUB grant number 620/08) and the Federal University of Santa Catarina (UFSC).

5 REFERÊNCIAS

CAON, T.; PORTO, L. C.; GRANADA, A.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A.; SIMOES, C. M.; BORSALI, R.; SOLDI, V. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 165-172, 2014.

DO NASCIMENTO, T. C. F.; CASA, D. M.; DALMOLIN, L. F.; DE MATTOS, A. C.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Development and Validation of an HPLC Method Using Fluorescence Detection for the Quantitative Determination of Curcumin in PLGA and PLGA-PEG Nanoparticles. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 4, p. 324-333, 2012.

GRANADA, A.; MURAKAMI, F. S.; SARTORI, T.; LEMOS-SENNA, E.; SILVA, M. A. Development and validation of an HPLC method to quantify camptothecin in polymeric nanocapsule suspensions. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 3, p. 551-556, 2008.

GRANADA, A.; TAGLIARI, M. P.; SOLDI, V.; SILVA, M. A.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; FERNANDES, D.; STULZER, H. K. Nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: validation of a stability-indicating HPLC method to evaluate the drug entrapment efficiency and in vitro release profiles. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 2, p. 276-281, 2013.

ISONO, T.; OTSUKA, I.; SUEMASA, D.; ROCHAS, C.; SATOH, T.; BORSALI, R.; KAKUCHI, T. Synthesis, Self-Assembly, and Thermal Caramelization of Maltoheptaose-Conjugated Polycaprolactones Leading to Spherical, Cylindrical, and Lamellar Morphologies. **Macromolecules**, v. 46, n. 22, p. 8932-8940, 2013.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 113-131, 2001.

MAZZARINO, L. O., I.; HALILA, S.; BUBNIAK LDOS, S.; MAZZUCCO, S.; SANTOS-SILVA, MC.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R. Xyloglucan-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer nanoparticles coated with chitosan as biocompatible mucoadhesive drug delivery system. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 5, p.709-719, 2014.

OTSUKA, I.; ISONO, T.; ROCHAS, C.; HALILA, S.; FORT, S.; SATOH, T.; KAKUCHI, T.; BORSALI, R. 10 nm Scale Cylinder-Cubic Phase Transition Induced by Caramelization in Sugar-Based Block Copolymers. **ACS Macro Letters**, v. 1, n. 12, p. 1379-1382, 2012a.

OTSUKA, I.; OSAKA, M.; SAKAI, Y.; TRAVELET, C.; PUTAUX, J. L.; BORSALI, R. Self-assembly of maltoheptaose-block-polystyrene into micellar nanoparticles and encapsulation of gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 29, n. 49, p. 15224-15230, 2013a.

RUGHANI, R. V.; SCHNEIDER, J. P. Molecular Design of beta-Hairpin Peptides for Material Construction. **MRS Bull**, v. 33, n. 5, p. 530-535, 2008.

SHIM, J.; SEOK KANG, H.; PARK, W. S.; HAN, S. H.; KIM, J.; CHANG, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 477-484, 2004.

TAKUYA, I.; OTSUKA, I.; KONDO, Y.; HALILA, S.; FORT, S.; ROCHAS, C.; SATOH, T.; BORSALI, R.; KAKUCHI, T. Sub-10 nm Nano-Organization in AB2 and AB3 Type Miktoarm Star Copolymers Consisting of Maltoheptaose and Polycaprolactone. **Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 1461-1469, 2013.

ZHAO, Y.; LIANG, H. J.; WANG, S. G.; WU, C. Self-assembly of poly(caprolactone-b-ethylene oxide-b-caprolactone) via a microphase inversion in water. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 4, p. 848-851, 2001.

CAPÍTULO 4

PRESENÇA DE CRISTAIS DE PROGESTERONA NAS VESÍCULAS POLÍMERICAS E SUA RELAÇÃO NA PERMEAÇÃO CUTÂNEA

1 INTRODUÇÃO

Polimorfismo é a habilidade de uma substância química de cristalizar-se em mais de uma forma cristalina, sendo que a diferença entre elas é o arranjo e/ou conformação diferente dos átomos ou moléculas na rede cristalina. Essas formas cristalinas são chamadas de polimorfos (GEOFF; Z.; ZHOU, 2009), sendo que na área farmacêutica essas substâncias sólidas podem ser tanto fármacos quanto excipientes. Apesar de ter a mesma composição química, os polimorfos apresentam diferenças na estrutura interna do cristal, portanto, apresentam diferenças nas propriedades físico-químicas (VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001). As diferenças nas características físico-químicas dos polimorfos incluem: solubilidade, velocidade de dissolução, estabilidade física e química, higroscopicidade e reatividade. As diferenças na solubilidade são de particular importância na indústria farmacêutica, podendo afetar a eficiência, biodisponibilidade e toxicidade do fármaco (BYRN, 1999; HUANG; TONG, 2004; CUFFINI, 2009).

Novas metodologias de cristalização têm sido desenvolvidas na procura e controle do polimorfismo. Mais recentemente a técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros (Polymer-induced heteronucleation, PIHn) tem demonstrado sucesso na descoberta de novas formas sólidas de fármacos como a carbamazepina (LANG; KAMPF; MATZGER, 2002), o sulfametoxazol (PRICE; GRZESIAK; MATZGER, 2005), o sulindaco, o flurbiprofeno (GRZESIAK; MATZGER, 2007), e o ácido tolfenâmico (LOPEZ-MEJIAS; KAMPF; MATZGER, 2009). Neste método o fármaco é cristalizado sobre superfícies poliméricas utilizando alguma das técnicas tradicionais de cristalização (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

Estudos recentes realizaram a técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros para obtenção e estabilização da forma metaestável da progesterona (ARAYA-SIBAJA et al., 2014). Duas formas cristalinas da progesterona são conhecidas desde os anos 70 e segundo Lancaster e colaboradores (2007) diferentes condições de cristalização para produzir estes dois polimorfos têm sido amplamente reportadas na literatura. Entretanto, existem ambiguidade e confusão em relação à quantidade e nomenclatura dos polimorfos da progesterona. A literatura reporta 5 polimorfos que foram identificados por microscopia

de Hot Stage no ano 1969 (LANCASTER; HARRIS; PEARSON, 2011). Atualmente, na base de compostos orgânicos depositados na CCDC (do inglês Cambridge Crystallographic Data Center), encontram-se 10 códigos relacionados com a progesterona ou com a fórmula $C_{21}H_{30}O_2$, dos quais 7 iniciam com o mesmo código de letras (PROGST), o que corresponderia a polimorfos da progesterona. No caso da nomenclatura para um dos polimorfos são usadas as seguintes notações: forma 1, forma I e forma α ; já para o outro são usadas: forma 2, forma II e forma β . Araya-Sibaja e colaboradores (2014) relataram que a técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros permitiu obter a forma 2 pura e em mistura com a forma 1, na maioria dos polímeros empregados. A concentração, os solventes e os polímeros influenciaram a cristalização seletiva dos polimorfos. A forma 2 foi estável sob condições de estabilidade acelerada, por 3 meses, dependendo do polímero e da concentração utilizada. Considerando que a forma 2 apresenta melhor solubilidade que a forma 1, os resultados obtidos são promissores para sugerir a utilização da forma 2 em dispositivos de liberação modificada. Este fato representa uma grande vantagem para aplicações farmacêuticas, pois permitiria diminuir a dose necessária para atingir a mesma biodisponibilidade alcançada com a forma 1.

A permeabilidade e a permeação cutânea de fármacos tem sido objeto de estudo constante com o objetivo de se estabelecer as rotas de permeação e a liberação transdérmica dos mesmos. No campo de sistemas nanoparticulados, diferentes sistemas carreadores e materiais poliméricos são descritos na literatura para liberação transdérmica: micro e nanopartículas (PROW, T. W. et al., 2011), micro e nano-emulsões (HOELLER, 2009; WANG, J. J. et al., 2009), vesículas não-iônicas (AZEEM; AHMAD; TALEGAONKAR, 2009), VPs lipídicas sólidas (MUNSTER et al., 2005; BHASKAR et al., 2009) e VPs a base de quitosana (HASANOVIC et al., 2010).

Neste contexto, sugere-se que o emprego de copolímeros para a obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos poderia favorecer simultaneamente a formação de cristais de fármacos e, conseqüentemente alterar sua liberação. Difração de raios X em pó (XRPD) e técnicas dispersivas de espectroscopia de Raman foram aplicados para investigar as propriedades físico-químicas dos polimorfos de progesterona nas vesículas poliméricas e posteriormente o estudo de permeação cutânea das vesículas poliméricas foi avaliado.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Materias

O hormônio esteróide progesterona (Pregn-4-ene-3, 20-diona, número CAS 57-83-0, estrutura mostrada na figura 8) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os copolímeros em bloco β Ciclodextrina-*b*-Poli(ϵ -prolactona) (β CD-*b*-PCL_{5k}) e Maltoheptaose-*b*-Poli(ϵ -prolactona) (Mal₇-*b*-PCL_{5k}) foram sintetizados via “click chemistry”, como previamente descrito no capítulo 2. Todos os outros materiais e solventes utilizados, com exceção dos utilizados na análise por CLAE, foram de grau analítico.

2.2 Preparações das VPs

As vesículas poliméricas contendo cristais de progesterona foram obtidas a partir da autoassociação dos copolímeros em bloco β Ciclodextrina-*b*-Poli(ϵ -prolactona) (β CD-*b*-PCL_{5k}) e Maltoheptaose-*b*-Poli- ϵ -prolactona (Mal₇-*b*-PCL_{5k}) através da técnica de inversão da microfase em água. Primeiramente, os copolímeros β CD-*b*-PCL_{5k} e Mal₇-*b*-PCL_{5k} foram dissolvidos em THF, a uma concentração de 370,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A incorporação da progesterona na vesículas foi realizada por dissolução de 50,0 μg de progesterona em 0,1 mL de cada solução de copolímeros (conforme descrito anteriormente). Para induzir a autoassociação, 0,1 mL de cada solução de copolímero em THF contendo progesterona foram adicionados gota a gota, sob agitação, a 4,9 mL de água ultrapura (Milli-Q®). Após a formação de vesículas poliméricas, o solvente orgânico foi removido utilizando um evaporador rotativo sob pressão reduzida.

2.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-MET)

As suspensões de VPs foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) empregando um equipamento JEM-101 da JEOL (Tóquio, Japão), operando com voltagem de aceleração de 80 kV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para o preparo das amostras, 5,0 μL de cada suspensão foram depositados em suportes de cobre e secas por 48 h, a temperatura ambiente.

Para a observação das amostras por cryo-MET, gotas das suspensões de VPs foram depositadas sobre suportes de cobre (lacey-gride) revestidas com uma camada de carbono e instantaneamente congeladas em etano líquido (-171°C). Cada amostra foi colocada em um crio-suporte Gatan 626® mantidas sob refrigeração com nitrogênio líquido e transferidas para o microscópio Philips CM200 operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV. As amostras foram observadas à baixa temperatura (-180°C) e utilizando o modo “low-dose” para reduzir os danos causados pela radiação nas áreas de interesse da amostra. As imagens foram registradas em filmes Kodak SO163 reveladas e digitalizadas com o auxílio de uma câmera Kodak Megaplug e do software Analysis 3.2.

2.4 Difração de raios X de pó (DRXP)

Os padrões de difração de raios X de pó das amostras foram obtidos em um difratômetro θ - θ (Xpert Pro, PanAlytical), com uma radiação de cobre $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), operando em uma corrente de 40 mA e voltagem de 45 kV, equipado com rotacionador de amostra e detector do tipo Real Time Multiple Strip (RTMS). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, sob ausência de luz, por meio de varredura angular a 2θ na faixa de 5° a 50° , com step angular de $0,016^{\circ}$ e step de tempo de 20 segundos, usando um detector de estado sólido linear (Xcelerator). As formas polimórficas foram identificados por comparação de padrões de difração de raio X de pó experimentais de progesterona e calculados a partir de dados cristalográficos da Forma 1 e 2 da progesterona disponíveis no banco de dados da Cambridge (CSD, Cambridge Structural Database) (PROGST12: Forma1 e PROGST13: Forma 2) (LANCASTER et al., 2007).

2.5 Espectroscopias vibracionais Raman

Os experimentos Raman foram realizados em geometria de espalhamento utilizando equipamento PeakSeeker 785 (RAM-PRO-785), operando com laser diodo de 785 nm e voltagem de 300 mW na fonte. A radiação Raman coletada foi dispersa e focada em dispositivo Peltier refrigerado dotado de uma câmera de dispositivo de carga acoplada (CCD), o qual permitiu a obtenção de uma resolução espectral de 6 cm^{-1} . O laser foi focado na amostra através de lentes objetivas com aumento de 20x, gerando um campo de análise de $2 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro. Todos os espectros foram registrados na janela espectral de 200 a 1800 cm^{-1} , com o mesmo tempo de aquisição (10 s). As amostras foram

dispostas em lâminas de vidro e as análises realizadas a temperatura ambiente.

2.6 Microscopia Eletrônica de Varreruda (MEV)

Para uma melhor visualização da superfície das amostras e dos cristais de progesterona formados a partir da obtenção de vesículas foram obtidas micrografias empregando microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV operado a 10 kV e 15 kV. As amostras previamente depositadas em lamínulas de vidro foram revestidas, sob vácuo, com ouro em uma atmosfera de argônio.

2.7 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da progesterona nas vesículas poliméricas

O doseamento da progesterona nas suspensões de vesículas foi realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AVVP, unidade de controle SCL-10AVP e auto-injetor Jasco AS-2055 Plus. As análises foram realizadas em sistema de fase reversa e modo isocrático utilizando pré-coluna (4,0 mm x 3,0 mm), coluna RP Phenomenex C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Torrance, CA), e o sistema mantido à temperatura de 25 ± 1 °C.

A fase móvel foi composta por metanol:água (84,5:15,5 v/v), com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, detecção UV a 254 nm e volume de injeção de 20 μ L. As áreas dos picos foram integradas automaticamente através do software Shimadzu Class VP® V 6.14. O método analítico para quantificar a progesterona nas vesículas poliméricas foi previamente validado baseado nos seguintes parâmetros de desempenho analítico: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão, e robustez (ICH, 2005).

A eficiência de encapsulação (%) e o teor do fármaco foram calculados após a determinação da concentração de progesterona nas suspensões de VPs por CLAE. A eficiência de encapsulação foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total de progesterona encontrada na suspensão de nanopartículas após a sua completa dissolução em solvente orgânico apropriado e a concentração do fármaco no sobrenadante obtido pelo procedimento de ultrafiltração/centrifugação das vesículas utilizando uma membrana de filtração Amicon-Ultra-0,5 (Celulose regenerada, corte (NMWL) de 100

KDA, Millipore Corp., USA), a 4500 rpm durante 30 minutos. O teor do fármaco nas suspensões foi expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.8 Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta

O diâmetro médio das VPs em suspensão foi determinado através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando um equipamento ALV-CGS 8F S/N 069, em diferentes ângulos (de 35° a 140°) durante 300s.

As medidas do potencial zeta médio das vesículas poliméricas foram realizadas a 25°C pela técnica de microeletroforese associada à anemometria Doppler de laser, através da submissão da amostra a um campo elétrico no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern).

2.9 Avaliação da permeação cutânea das vesículas poliméricas contendo progesterona

Inicialmente, as orelhas de porco foram obtidas em um matadouro situado na cidade de Antônio Carlos (SC) e armazenadas em tampão Krebs, a 4°C , até o seu processamento. Antes da utilização, as orelhas foram lavadas com água destilada, os pêlos foram cortados tendo sido selecionadas as partes íntegras, livres de lesões ou manchas. Com auxílio de pinça anatômica, bisturi e tesoura, procedeu-se à dissecação extraíndo conjuntamente derme e epiderme, descartando a hipoderme (tecidos subcutâneos e gordurosos subjacente à derme). Após fragmentação, as amostras dissecadas de pele foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a -80°C , imersas em solução tampão de Krebs. O período de armazenamento variou entre um e dois meses.

O descongelamento foi realizado à temperatura ambiente (25°C), com adição da solução tampão de Krebs.

A permeabilidade da progesterona foi avaliada através do modelo *ex vitro* da câmara de difusão de Franz (descrito nas considerações preliminares deste capítulo). As câmaras de Franz foram alocadas no banho termostatzado (37°C) com agitação multiponto (Dist). O compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de tampão PBS:etanol (70:30 v/v), proporção esta definida de modo a obter uma condição *sink*. O tecido foi disposto na interface dos compartimentos da câmara de Franz e o sistema de agitação foi acionado (± 800 rpm).

No compartimento doador foram depositados 2,0 mL de cada amostra com teor de progesterona de $\pm 100 \mu\text{g/mL}$: vesículas de $\beta\text{CD-}b\text{-PCL}_{5k}$ contendo progesterona, vesículas de $\text{Mal7-}b\text{-PCL}_{5k}$ contendo progesterona, além de solução hidroalcoólica 50% de progesterona. Em intervalos pré-determinados, coletaram-se alíquotas de $400 \mu\text{L}$ pela

cânula de amostragem lateral (com reposição de quantidade equivalente de solução) e imediatamente armazenadas a -20°C .

Para a quantificação de progesterona, as amostras foram secas sob vácuo durante 12 h (speed vac[®]) e ressuspensas em 200 μL de fase móvel. A seguir foram agitadas em aparato do tipo vortex[®] por 5 min, centrifugadas por igual período e analisadas através de CLAE utilizando método previamente validado. Após a quantificação das amostras, cálculos dos tempos de latência (L_T), dos fluxos constantes (J) e dos coeficientes de permeabilidade (P) foram realizados através de equações pautadas nas Leis de Fick, incluindo a plotagem gráfica das quantidades permeadas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo. O estado de fluxo constante (J) foi obtido pelo coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) (MASHRU et al., 2005). O tempo de latência (T_L) foi calculado a partir da extrapolação da linha do estado estacionário (BARRY, 2002) e o coeficiente de permeabilidade foi obtido da relação entre o fluxo e concentração inicial no compartimento doador.

A retenção da progesterona na epiderme e na derme foi avaliada após 24h do início do experimento. Os fragmentos de derme e epiderme gerados foram colocados separadamente em tubos contendo 3,0 mL de metanol (líquido extrator) e mantidos em repouso por 24 h. Após este período, os tubos contendo as amostras foram submetidos à agitação (Vortex[®], 5 min) e banho ultrassônico (15 min) para o rompimento das células e aumento da eficiência de extração. Restos celulares, proteínas e outros interferentes foram removidos através de precipitação com acetonitrila, seguindo de centrifugação e, finalmente, as amostras foram quantificadas por CLAE.

2.10 Análise estatística

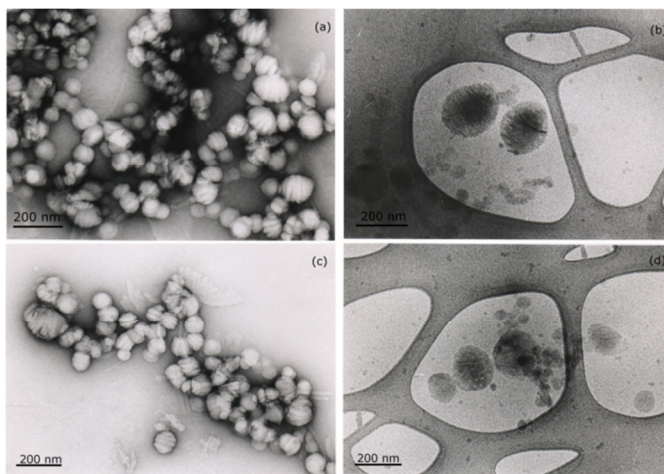
Todos os experimentos foram realizados com, no mínimo, três repetições independentes. A comparação entre os diferentes valores de fluxo, de tempo de latência e os coeficientes de permeabilidade obtidos foi realizada por análise de variância (ANOVA/Tukey), incluindo testes de comparações múltiplas (SNK). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanopartículas, na forma de vesículas poliméricas, preparadas a partir dos copolímeros em bloco β CD-*b*-PCL_{5k} e Mal₇-*b*-PCL_{5k} foram avaliadas quanto à capacidade de formar cristais de progesterona e a influência destes cristais na permeação cutânea do fármaco, incorporado nas vesículas. A cristalização da progesterona nestas suspensões de VPs foi confirmada a partir da observação da superfície das mesmas por técnica de imagem como a criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-MET), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As vesículas poliméricas contendo progesterona (Figura 1) apresentaram superfícies estriadas quando observadas por MET e cryo-MET indicando a presença de cristais de progesterona nos sistemas nanoestruturados poliméricos. Araya-Sibaja e colaboradores (2014) estudaram a cristalização da progesterona sobre matrizes poliméricas a partir da técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros (PIHn) relatando que esta técnica permitiu obter a forma 2 pura e em mistura com a forma 1, na maioria dos polímeros empregados, além de sugerir que a concentração, os solventes e os polímeros parecem influenciar a cristalização dos polimorfos de forma seletiva. Este estudo corrobora com o fato que o desenvolvimento de nanopartículas a partir de copolímeros pode ter sido responsável por induzir a cristalização da progesterona nas vesículas poliméricas.

Figura 1. Micrografia de MET para as vesículas contendo progesterona do copolímero (a) β CD-*b*-PCL_{5k} e (c) Mal₇-*b*-PCL_{5k}; micrografia de cryo-TEM em alta magnificação para as vesículas contendo progesterona do copolímero (b) β CD-*b*-PCL_{5k} e (d) Mal₇-*b*-PCL_{5k}.



Para confirmar o processo de cristalização da progesterona favorecida pela interação com os copolímeros, filmes obtidos de suspensão de vesículas de β CD-*b*-PCL_{5k} e Mal₇-*b*-PCL_{5k} contendo progesterona foram caracterizados por outras técnicas (DRXP, espectroscopias vibracionais Raman e MEV). Primeiramente, as formas polimórficas da progesterona pura 1 e 2 foram analisadas e comparadas com os dados cristalográficos depositados no banco de dados da Cambridge (CSD, do inglês Cambridge Structural Database) (PROGST12: Forma 1 e PROGST13: Forma 2) (LANCASTER et al., 2007). Os padrões de difração de raios X de pó experimentais e calculados dos dois polimorfos da progesterona apresentam várias reflexões sobrepostas, sendo assim, selecionamos aquelas intensas sem sobreposição a 12,95 ° para a forma 1 e 13,95° e 16,42 ° para a forma 2. Estas reflexões são intensas e não se sobrepõem. Subsequentemente, estes padrões foram utilizados como referência para analisar as amostras obtidas na cristalização da progesterona a partir da obtenção de vesículas poliméricas.

O padrão de difração de raios X de pó dos copolímeros β CD-*b*-PCL_{5k} e Mal7-*b*-PCL_{5k} foram comparados com os difratogramas das vesículas com e sem fármaco. Conforme pôde ser observada nas Figuras 2 e 3, a técnica de obtenção das vesículas foi responsável pela amorfização dos copolímeros, para ambos os sistemas. Nas VPs com base em β CyD-*b*-PCL_{5k} contendo progesterona foi observada a presença de mistura das formas polimórficas 1 e 2.

Figura 2. Difratogramas referentes às vesículas com base em β CyD-*b*-PCL_{5k} contendo progesterona, vesículas com base em β CyD-*b*-PCL_{5k} sem fármaco e o copolímero β CD-*b*-PCL_{5k} em pó.

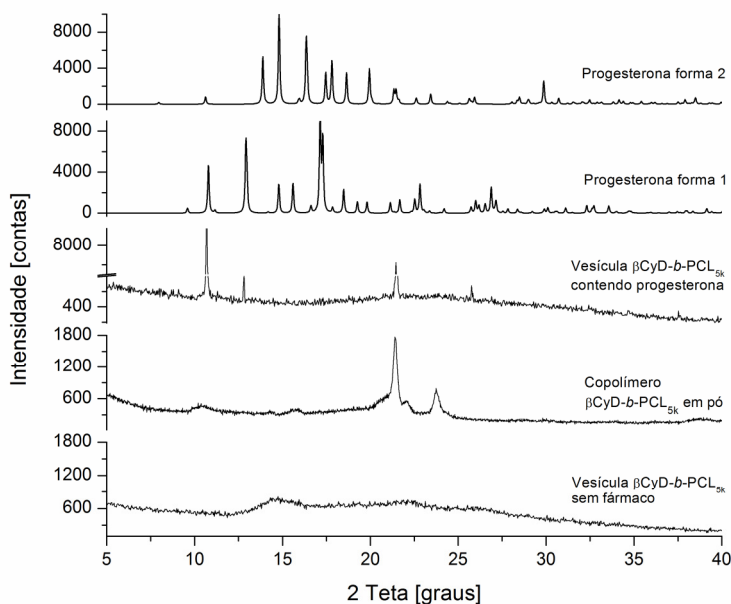
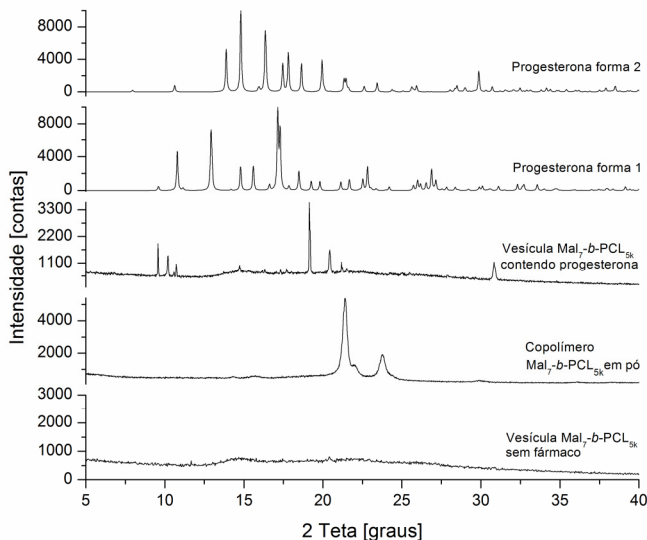
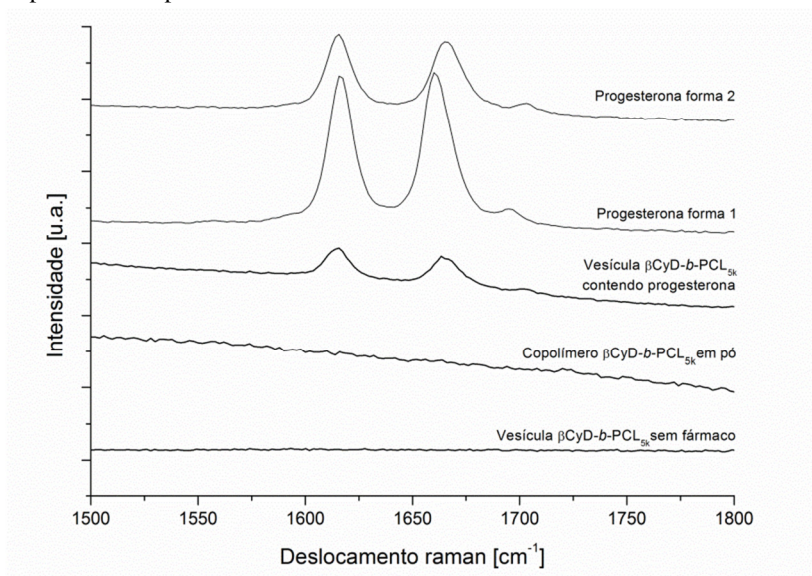


Figura 3. Difratomogramas referentes às vesículas com base em $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ contendo progesterona, vesículas com base em $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ sem fármaco e o copolímero $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ em pó.



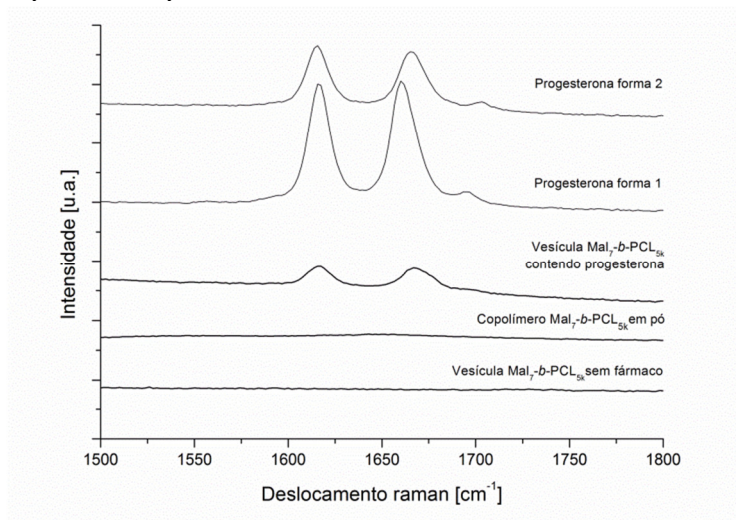
O espectro Raman do copolímero $\beta\text{CD-}b\text{-PCL}_{5k}$ comparado com as vesículas poliméricas correspondentes contendo progesterona e sem fármaco apresentou uma banca característica observada a 1665 cm^{-1} referente a forma 2 para as vesículas incorporadas com progesterona (Figura 4). Estes resultados corroboram com a presença de cristais de progesterona que apresentam bandas características para a forma 1 em 1660 cm^{-1} que é deslocado a 1665 cm^{-1} quando na forma 2 (WANG, F. W., J. A.; ANTOSZ, F. J.; BERGLUND, K. A. , 2000).

Figura 4. Espectros Raman referentes às vesículas com base em β CD-*b*-PCL_{5k} contendo progesterona, vesículas com base em β CD-*b*-PCL_{5k} sem fármaco e copolímero em pó.



Para as vesículas com base em Mal₇-*b*-PCL_{5k} (Figura 5) foi observada a presença de mistura das formas polimórficas 1 e 2 da progesterona, no entanto, um terceira reflexão (*) foi observada indicando a possibilidade de outra forma polimórfica não identificada.

Figura 5. Difratomogramas referentes às vesículas com base em $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ contendo progesterona, vesículas com base em $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ sem fármaco e copolímero em pó.



O espectro Raman do copolímero $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$ comparado com as VPs contendo progesterona e sem fármaco apresentou resultados semelhantes as amostras de $\beta\text{CD-}b\text{-PCL}_{5k}$, indicando uma banda característica observada a 1668 cm^{-1} referente a forma 2 para as vesículas incorporadas com progesterona (Figura 5).

Araya-Sibaja e colaboradores (2014) relataram que a técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros pode contribuir para uma cristalização seletiva de polimorfos de progesterona dependendo das interações entre fármacos e diferentes tipos de polímeros. Este fato pôde ser observado nas imagens de MEV referentes aos cristais de progesterona obtidos a partir de VPs ilustradas nas Figura 6 e 7. As vesículas com base em $\beta\text{CD-}b\text{-PCL}_{5k}$ contribuíram para a maior formação de cristais de progesterona na superfície das mesmas quando comparadas às vesículas com base em $\text{Mal}_7\text{-}b\text{-PCL}_{5k}$, estes dados corroboram com as diferenças de intensidade observadas nos padrões de difração de raio X (Figura 2 e 4), em que as VPs obtidas a partir de $\beta\text{CD-}b\text{-PCL}_{5k}$ apresentaram menor intensidade relativa a maior presença de cristais.

Figura 6. Fotomicrografias obtidas por MEV referentes aos cristais de progesterona obtidos a partir de vesículas com base em β CD-*b*-PCL_{5k}.

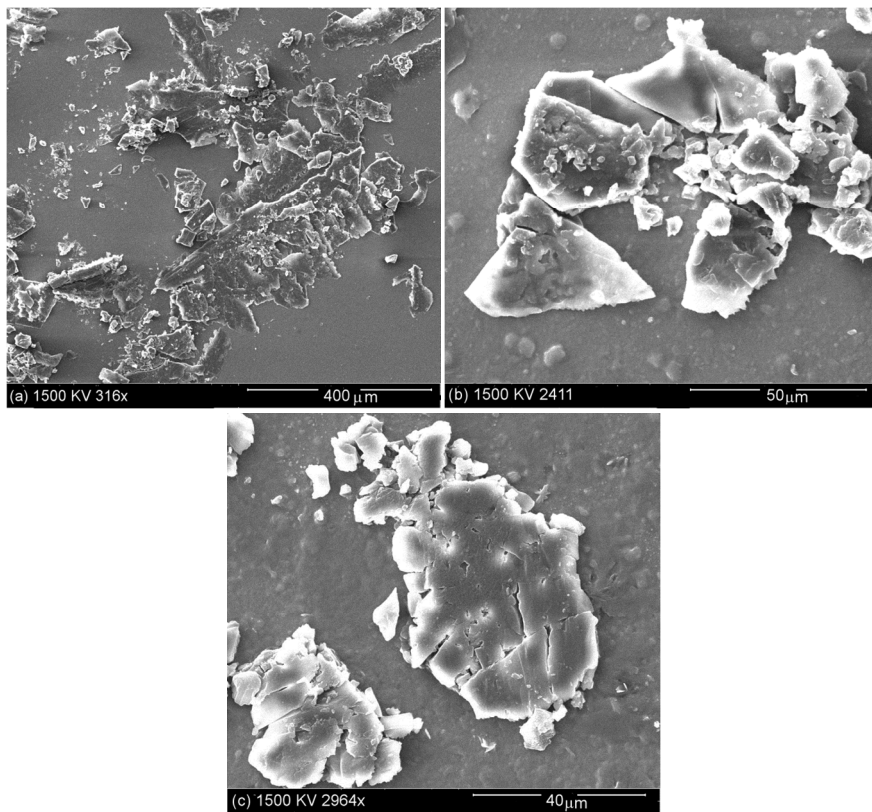
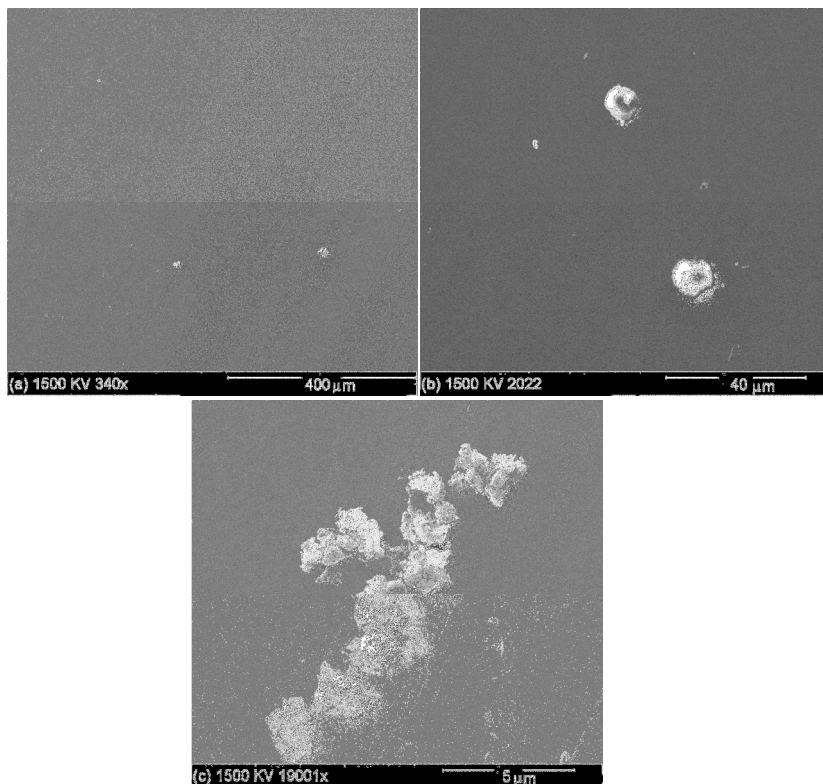


Figura 7. Fotomicrografias obtidas por MEV referentes aos cristais de progesterona obtidos a partir de vesículas com base em Mal₇-b-PCL_{5k}.



Posteriormente a confirmação de cristais de progesterona nas vesículas poliméricas, estas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, teor de fármaco, potencial zeta e eficiência de encapsulação para a realização do estudo de permeação cutânea. Estes resultados encontram-se na tabela 1. Para uma avaliação precisa em relação às dimensões dos sistemas após o processo de encapsulação da progesterona medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram efetuados. Os dados de DLS demonstraram valores de R_H de 85 nm após a incorporação da progesterona nos sistemas nanoestruturados baseados em β CD-*b*-PCL_{5k}, enquanto para os sistemas com base em Mal₇-*b*-

PCL_{5k} os valores de R_H foram de 50,2 nm. Os valores de potencial zeta para ambos os sistemas apresentaram-se negativos.

Tabela 1. Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor de progesterona (µg/mL), diâmetro médio de partícula (nm) e pontecial zeta (mV) das VPs contendo progesterona.

Vesículas poliméricas	EE (%)	Teor (µg mL⁻¹)	Diâmetro médio de partícula (nm)	Potencial zeta médio (mV)
βCyD- <i>b</i> - PCL _{5k}	97,0	100,0	170,0	-39,5
Mal ₇ - <i>b</i> -PCL _{5k}	98,4	100,0	100,4	-48,3

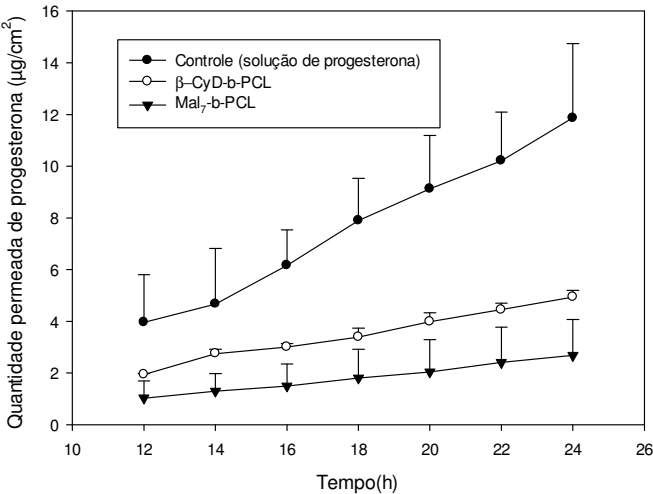
A permeação cutânea da progesterona a partir dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos foi realizada a fim de avaliar a influência da presença de cristais de progesterona presentes nas vesículas sobre os parâmetros de permeabilidade tais como, fluxo, tempo de latência e coeficiente de permeabilidade do fármaco através de peles de orelha suína (modelo *in vitro*). Ambos os sistemas nanoestruturados reduziram a absorção sistêmica da progesterona, o que pode ser observado pelos menores valores de P (coeficiente de permeabilidade) e J (fluxo), comparativamente ao controle (solução de progesterona) que estão demonstrados na tabela 2. O gráfico de perfil de permeação (figura 8) que relacionam a quantidade permeada por unidade de área em função do tempo permitem extrair estas mesmas conclusões. Maior quantidade de fármaco atingiu o compartimento receptor após o tratamento apenas com a solução de progesterona. O sistema Mal₇-*b*-PCL foi o que apresentou uma redução mais significativa nos valores de fluxo de permeação e coeficiente de permeabilidade (p<0.05; ANOVA/Tukey).

Tabela 2. Parâmetros de permeabilidade das diferentes preparações de progesterona (n = 3). Resultados foram expressos como média ± desvio-padrão.

	Controle	βCD- <i>b</i> -PCL	Mal- <i>b</i> -PCL
J (µg/cm²)	0,674588 ± 0,028992 ^a	0,238896 ± 0,014521 ^b	0,137651 ± 0,023878 ^c
	0,006746 ± 0,00029 ^a	0,002389 ± 0,000145 ^b	0,001377 ± 0,000239 ^c
	6,852571 ± 0,960251 ^a	3,686835 ± 0,279829 ^b	5,482791 ± 0,298485 ^a
P (cm/h)			
Lag time			

A análise estatística (ANOVA/Tukey) foi realizada para cada parâmetro de permeabilidade (J, P e lag time) separadamente. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos.

Figura 8. Perfil de permeação da progesterona através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações. (média ± SD, n = 3).

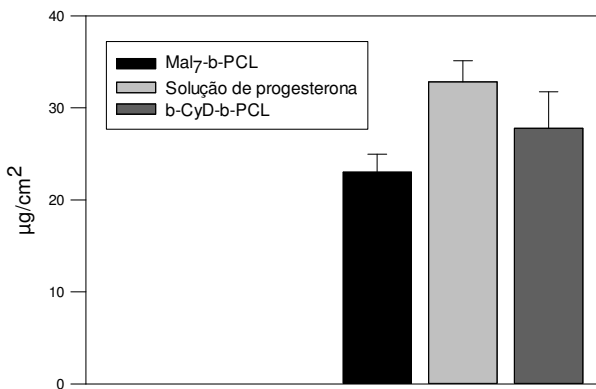


A redução nos parâmetros de permeação para ambos os sistemas nanoparticulados pode ser explicada pela presença de cristais de fármaco, uma vez que, ambos os sistemas foram constituídos por uma mistura de polimorfos da progesterona nas formas 1e 2. Especialmente para as vesículas constituídas por βCD-*b*-PCL, evidenciou-se no DRX (figura 2) uma menor intensidade das reflexões

dos polimorfos, indicando maior quantidade de cristais, estes resultados também foram observados nas imagens obtidas por MEV (figura 6) demonstrando que estes cristais de progesterona se distribuíram preferencialmente na superfície destas vesículas. Estes dados correlacionam-se com a permeação cutânea, pois os cristais de progesterona seriam mais rapidamente liberados a partir de vesículas com base em β CD-*b*-PCL, uma vez que estão localizados na superfície, em relação aos maiores valores de liberação deste sistemas comparativamente as vesículas obtidas a partir de Mal7-*b*-PCL. Após liberação das VPs, os cristais poderiam se dissociar em meio aquoso, em uma razão que aumenta à medida que vão permeando pela pele. Em outras palavras, quanto mais fármaco permeia/penetra a pele, maior será a dissociação destes nanocristais, aumentando ainda mais a quantidade de fármaco livre.

Tendo em vista que os sistemas nanoparticulados apresentaram menor retenção de fármaco na pele que o controle de progesterona (Figura 9), é provável que o fármaco tenha que ser liberado dos sistemas nanoparticulados anteriormente a sua absorção na pele. Estes dados corroboram com a literatura no que concerne aos sistemas nanoestruturados poliméricos, estes por sua vez, não permeiam o estrato córneo, mas sim se desestabilizam na superfície da pele penetrando via folicular e conduzindo, em seguida, a liberação do fármaco incorporado (LUENGO et al., 2006; DESAI; PATLOLLA; SINGH, 2010).

Figura 9. Retenção cutânea (estrato córneo+derme+epiderme) de diferentes preparações da progesterona.



Por outro lado, a formação/preparação de nanocristais também tem sido uma estratégia adotada por alguns pesquisadores para direcionar o transporte de fármaco através da via folicular (ZHAI et al., 2014). Dessa forma, caso estes nanocristais não se dissociem em meio aquoso, pode ocorrer um direcionamento dos mesmos por este via. Como β CD-*b*-PCL apresenta maior quantidade de nanocristais de superfície, maior direcionamento folicular seria observado para este sistema contribuindo com os maiores valores de absorção e retenção observados para esta formulação. O menor valor de lag time também sustenta esta hipótese de um direcionamento folicular, que encurtaria o caminho a ser percorrido pelo fármaco, que ao invés de percorrer todas as camadas da pele (estrato córneo + epiderme + derme), atravessaria apenas a derme, rapidamente alcançando o compartimento receptor.

Os resultados descritos acima conduzem para aplicação de ambos os sistemas nanoestruturados com base em β CD-*b*-PCL e Mal7-*b*-PCL no sentido de controlar a liberação da progesterona na circulação sanguínea, podendo ser viabilizados como adesivos transdérmicos com lenta liberação. Por outro lado, os dois sistemas podem ser empregados simultaneamente em uma mesma formulação tópica, favorecendo tanto a liberação controlada quanto a ação local da progesterona devido às diferenças de permeação/retenção cutânea.

4 CONCLUSÕES

A incorporação de progesterona nos sistemas nanoparticulados β CD-*b*-PCL e Mal7-*b*-PCL a partir da técnica de inversão da microfase em água promoveu a cristalização seletiva de progesterona dependente do copolímero, sendo encontrado em ambos os sistemas uma misturas dos polimorfos na forma 1 e 2. Os sistemas nanoestruturados desenvolvidos podem ser utilizados topicamente nos casos em que uma liberação controlada é desejada, tendo em vista a baixa taxa de permeação da progesterona, o que confere certa segurança na administração. Ambos os sistemas proporcionaram menor retenção de progesterona na pele em relação ao fármaco livre, este efeito pode ser atribuído à composição polimérica das nanopartículas favorecendo a sua aplicação tópica.

5 REFERÊNCIAS

ARAYA-SIBAJA, A. M.; FANDARUFF, C.; CAMPOS, C. E.; SOLDI, V.; CARDOSO, S. G.; CUFFINI, S. L. Morphology study of progesterone polymorphs prepared by polymer-induced heteronucleation (PIHn). **Scanning**, v. 35, n. 4, p. 213-221, 2014.

AZEEM, A.; AHMAD, F. J.; TALEGAONKAR, S. Exploration of skin permeation mechanism of frusemide with proniosomes. **Pharmazie**, v. 64, n. 11, p. 735-740, 2009.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: York, E. N. (Ed.). **AULTON, M.E. (ed.) Pharmaceutics: The science of dosage form design**. Churchill Livingstone, 2002, p.499-533.

BHASKAR, K.; MOHAN, C. K.; LINGAM, M.; MOHAN, S. J.; VENKATESWARLU, V.; RAO, Y. M.; BHASKAR, K.; ANBU, J.; RAVICHANDRAN, V. Development of SLN and NLC Enriched Hydrogels for Transdermal Delivery of Nitrendipine: In Vitro and In Vivo Characteristics. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 1, p. 98-113, 2009.

BYRN, S. P., R.; STOWELL, J. **Solid-State chemistry of drugs**: Indiana: SSCI, Inc., 1999.

CUFFINI, S. P. J., A.; TOMBARDI, D. . Polimorfismo em Fármacos. In: Guanabara, E. (Ed.). **Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica, 2009.

DESAI, P.; PATLOLLA, R. R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, n. 7, p. 247-259, 2010.

GEOFF, G. Z.; Z., Z.; ZHOU, D. Crystalline and Amorphous Solids. In: (Ed.). **Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and Practice**. United States of America: Elsevier Inc, 2009, p.25-60.

GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. New form discovery for the analgesics flurbiprofen and sulindac facilitated by polymer-induced heteronucleation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 11, p. 2978-2986, 2007.

HASANOVIC, A.; HOLLICK, C.; FISCHINGER, K.; VALENTA, C. Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 148-153, 2010.

HOELLER, S. S., A.; VALENTA, C. . Lecithin based nanoemulsions: a comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n., p., 2009.

HUANG, L. F.; TONG, W. Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 321-334, 2004.

LANCASTER, R. W.; KARAMERTZANIS, P. G.; HULME, A. T.; TOCHER, D. A.; LEWIS, T. C.; PRICE, S. L. The polymorphism of progesterone: stabilization of a 'disappearing' polymorph by co-crystallization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 12, p. 3419-3431, 2007.

LANCASTER, R. W.; HARRIS, L. D.; PEARSON, D. Fifty-year old samples of progesterone demonstrate the complex role of synthetic impurities in stabilizing a metastable polymorph. **Crystengcomm**, v. 13, n. 6, p. 1775-1777, 2011.

LANG, M. D.; KAMPF, J. W.; MATZGER, A. J. Form IV of carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p. 1186-1190, 2002.

LOPEZ-MEJIAS, V.; KAMPF, J. W.; MATZGER, A. J. Polymer-Induced Heteronucleation of Tolfenamic Acid: Structural Investigation of a Pentamorph. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 13, p. 4554, 2009.

LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K. H.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 4, p. 190-197, 2006.

MASHRU, R.; SUTARIYA, V.; SANKALIA, M.; SANKALIA, J. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 54-62, 2005.

MUNSTER, U.; NAKAMURA, C.; HABERLAND, A.; JORES, K.; MEHNERT, W.; RUMMEL, S.; SCHALLER, M.; KORTING, H. C.; ZOUBOULIS, C. C.; BLUME-PEYTAVI, U.; SCHAFER-KORTING, M. RU 58841-myristate - prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia. **Pharmazie**, v. 60, n. 1, p. 8-12, 2005.

PRICE, C. P.; GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. Crystalline polymorph selection and discovery with polymer heteronuclei. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 15, p. 5512-5517, 2005.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

RODRIGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C. P.; JAYASANKAR, A.; MATZGER, A. J.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 241-274, 2004.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.

WANG, F. W., J. A.; ANTOSZ, F. J.; BERGLUND, K. A. . An investigation of solvent-mediated polymorphic transformation of

progesterone using in situ Raman spectroscopy. **Organic Process Research & Development**, v. 4, n. 5, p., 2000.

WANG, J. J.; LIU, K. S.; SUNG, K. C.; TSAI, C. Y.; FANG, J. Y. Skin permeation of buprenorphine and its ester prodrugs from lipid nanoparticles: lipid emulsion, nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 8, p. 734-747, 2009.

ZHAI, X.; LADEMANN, J.; KECK, C. M.; MULLER, R. H. Dermal nanocrystals from medium soluble actives - physical stability and stability affecting parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 85-91, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver sistemas nanoparticulados utilizando os copolímeros em bloco sintetizados β CD-*b*-PCL_{5k} e Mal₇-*b*-PCL_{5k} para incorporação de dois fármacos modelos para uso tópico, progesterona e propionato de clobetasol. Os oligossacarídeos constituintes do bloco hidrofílico do copolímero, a β ciclodextrina e a maltoheptaose₇, possuem características biofarmacêuticas interessantes para esta aplicação, como funcionalidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. As ciclodextrinas e seus derivados hidrofílicos podem aumentar a solubilidade e estabilidade de fármacos em preparações dérmicas, enquanto seus derivados hidrofóbicos podem modificar a permeabilidade dos fármacos através da pele.

A técnica de autoassociação por inversão da microfase em água, utilizada no preparo das nanopartículas, favoreceu a formação de vesículas com uma estreita faixa de distribuição de tamanho e alta capacidade de encapsulação para os fármacos selecionados, sendo que a eficiência de encapsulação obtida tanto para a progesterona quanto para o propionato de clobetasol foi superior a 98%. Além disso, esta técnica apresenta a vantagem de utilizar pouquíssima quantidade de solventes orgânicos no processo, conferindo segurança para aplicações farmacêuticas. A caracterização físico-química das vesículas poliméricas demonstrou que o tamanho de partícula das mesmas foi dependente do copolímero empregado, sendo obtidos tamanho de 144 nm para as VPs de β Cd-*b*-PCL_{5k}, e de 68 nm para as VPs de Mal₇-*b*-PCL_{5k}. Além disso, todas as VPs apresentaram potencial zeta negativo conferindo estabilidade físico-química aos sistemas nanoestruturados.

O estudo de permeação cutânea avaliou a influência de cristais de progesterona presentes nas VPs na permeabilidade demonstrando que estes diminuem a permeabilidade da progesterona em relação ao fármaco livre. As vesículas apresentaram baixa taxa de permeação do fármaco, sendo ideais para uma formulação tópica com liberação controlada.

REFERÊNCIAS

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 16, n. 1-4, p. 3-27, 1999.

AACHMANN, F. L.; OTZEN, D. E.; LARSEN, K. L.; WIMMER, R. Structural background of cyclodextrin-protein interactions. **Protein Engineering**, v. 16, n. 12, p. 905-912, 2003.

AGARWAL, A.; SARAF, S.; ASTHANA, A.; GUPTA, U.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N. K. Ligand based dendritic systems for tumor targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, n. 1-2, p. 3-13, 2008.

ALIABADI, H. M.; LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, n. 1, p. 139-162, 2006.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 16, n. 1-4, p. 3-27, 1999.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. V.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 325-340 p.

AMMAR, H. O.; EL-NAHHAS, S. A.; GHORAB, M. M.; SALAMA, A. H. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as drug delivery system. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 127-136, 2012.

AMMAR, H. O., EL-NAHHAS, S. A., GHORAB, M. M., SALAMA, A. H. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as drug delivery system. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 72, n., p., 2012.

ARAYA-SIBAJA, A. M.; FANDARUFF, C.; CAMPOS, C. E.; SOLDI, V.; CARDOSO, S. G.; CUFFINI, S. L. Morphology study of

progesterone polymorphs prepared by polymer-induced heteronucleation (PIHn). **Scanning**, v. 35, n. 4, p. 213-221, 2014.

ARAYACHUKEAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. P.; TREE-UDOM, T. Retinyl acetate-loaded nanoparticles: Dermal penetration and release of the retinyl acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 281-288, 2011.

ARCHONTAKI, H. A.; VERTZONI, M. V.; ATHANASSIOU-MALAKI, M. H. Study on the inclusion complexes of bromazepam with beta- and beta-hydroxypropyl-cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 3-4, p. 761-769, 2002.

AZEEM, A.; AHMAD, F. J.; TALEGAONKAR, S. Exploration of skin permeation mechanism of frusemide with proniosomes. **Pharmazie**, v. 64, n. 11, p. 735-740, 2009.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: York, E. N. (Ed.). **AULTON, M.E. (ed.) Pharmaceutics: The science of dosage form design**. Churchill Livingstone, 2002, p.499-533.

BATES, F. S.; FREDRICKSON, G. H. Block copolymer thermodynamics: Theory and Experiment Annual Review of Physical Chemistry. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 525-557, 1990.

BETTINETTI, G. R.; MURA, R.; MELANI, F.; RILLOSI, M.; GIORDANO, F. Interactions Between Naproxen and Maltoheptaose, the Non-Cyclic Analog of β -Cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry**, v. 25, n., p. 327-338, 1996.

BHASKAR, K.; MOHAN, C. K.; LINGAM, M.; MOHAN, S. J.; VENKATESWARLU, V.; RAO, Y. M.; BHASKAR, K.; ANBU, J.; RAVICHANDRAN, V. Development of SLN and NLC Enriched Hydrogels for Transdermal Delivery of Nitrendipine: In Vitro and In Vivo Characteristics. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 1, p. 98-113, 2009.

BLANAZS, A.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological

Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, n. 4-5, p. 267-277, 2009.

BOLZINGER, M.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BRINKHUIS, R. P.; RUTJES, F. P. J. T.; HEST, J. C. M. Polymeric vesicles in biomedical applications. **Polymer Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 1449-1462, 2011.

BRIONES, E.; COLINO, C. I.; LANAO, J. M. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. **Journal Control Release**, v. 125, n. 3, p. 210-227, 2008.

BUCK, P. S. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 14, n. 2, p. 70-76, 2004.

BURCHARD, W.; PATTERSON, G. D. **Light Scattering from Polymers** secondary title: Springer Berlin Heidelberg, 1983. 48.

BURCHARD, W. Structure formation by polysaccharides in concentrated solution. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 342-353, 2001.

BYRN, S. P., R.; STOWELL, J. **Solid-State chemistry of drugs**: Indiana: SSCI, Inc., 1999

CAI, K.; ODE, M.; MURAKAMI, H. Influence of polyelectrolyte dispersants on the surface chemical properties of aluminum in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 284, n., p. 458-463, 2006.

CAON, T.; PORTO, L. C.; GRANADA, A.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A.; SIMOES, C. M.; BORSALI, R.; SOLDI, V. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n., p. 165-172, 2014.

CARLSEN, A.; LECOMMANDOUX, S. Self-assembly of polypeptide-based block copolymer amphiphiles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 329-339, 2009.

CAVALLI, R.; PEIRA, E.; CAPUTO, O.; GASCO, M. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, n. 1, p. 59-69, 1999.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, 1998.

CHANG, S. K.; WILLIAMS, P. L.; DAUTERMAN, W. C.; RIVIERE, J. E. Percutaneous absorption, dermatopharmacokinetics and related biotransformation studies of carbaryl, lindane, malathion, and parathion in isolated perfused porcine skin. **Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 269-280, 1994.

CHOUCAIR, A.; LAVIGUEUR, C.; EISENBERG, A. Polystyrene-b-poly(acrylic acid) vesicle size control using solution properties and hydrophilic block length. **Langmuir**, v. 20, n. 10, p. 3894-3900, 2004.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 9, n. 2, p. 99-134, 2002.

CROTHERS, M.; ATTWOOD, D.; COLLETT, J. H.; YANG, Z.; BOOTH, C.; TABOADA, P.; MOSQUERA, V.; RICARDO, N. P. S.; MARTINI, L. G. A. Micellization and Gelation of Diblock Copolymers of Ethylene Oxide and Styrene Oxide in Aqueous Solution. **Langmuir**, v. 18, n. 22, p. 8685-8691, 2002.

CUFFINI, S. P. J., A.; TOMBARDI, D. . Polimorfismo em Fármacos. In: Guanabara, E. (Ed.). **Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica, 2009,

DALMORA, M. E.; DALMORA, S. L.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, n. 1, p. 45-55, 2001.

DELGADO, A. V.; GONZALEZ-CABALLERO, F.; HUNTER, R. J.; KOOPAL, L. K.; LYKLEMA, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, n. 2, p. 194-224, 2007.

DESAI, P.; PATLOLLA, R. R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, n. 7, p. 247-259, 2010.

DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer vesicles. **Science**, v. 297, n. 5583, p. 967-973, 2002.

DO NASCIMENTO, T. C. F.; CASA, D. M.; DALMOLIN, L. F.; DE MATTOS, A. C.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Development and Validation of an HPLC Method Using Fluorescence Detection for the Quantitative Determination of Curcumin in PLGA and PLGA-PEG Nanoparticles. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 4, p. 324-333, 2012.

DU, J.; O'REILLY, R. K. Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. **Soft Matter**, v. 5, n. 19, p. 3544-3561, 2009.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWE, D. Amphiphilic cyclodextrins and targeting of drugs. In: International Symposium on Cyclodextrins, 1996, Budapest:Kluwer Academic Publishers, p. 423-430.

DUMITRIU, S. **Polysaccharides as biomaterials**. New York Marcel Dekker, 2001

EHRlich, H. P.; WHITE, M. E. Effects of Increased Concentrations of Prostaglandin-E Levels with Epidermolysis Bullosa Dystrophica

Recessive Fibroblasts within a Populated Collagen Lattice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, n. 6, p. 572-575, 1983.

FANG, J. Y.; SHEN, K. L.; HUANG, Y. B.; WU, P. C.; TSAI, Y. H. Evaluation of topical application of clobetasol 17-propionate from various cream bases. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 1, p. 7-14, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu, 2010
 FARRELL, R. A.; FITZGERALD, T. G.; BORAH, D.; HOLMES, J. D.; MORRIS, M. A. Chemical Interactions and Their Role in the Microphase Separation of Block Copolymer Thin Films. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, n. 9, p. 3671-3672, 2009.

FILIPOVIC-GRICIC, J.; BECIREVIC-LACÁN, M.; SKALKO, N.; JALSENJAK, I. Chitosan microspheres of nifedipine and nifedipine-cyclodextrin inclusion complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 135, n. 1-2, p. 183-190, 1996.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FORSTER, M.; BOLZINGER, M. A.; FESSI, H.; BRIANCON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-323, 2009.

FÖRSTER, M.; BOLZINGER, M.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-323, 2009.

FRANTZ, S. W. Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells in methodology for skin absorption. In: Press, C. (Ed.). **Method for skin absorption**. Florida, 2000,
 FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in Pharmacy**. Dordrecht: London: Kluwer Academic Publishers, 1994, v.5
 GAGLIARDI, L.; DE ORSI, D.; MANNA, F.; TONELLI, D. Hplc determination of clobetasol propionate in cosmetic products. **Journal**

Of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 23, n. 3, p. 355-362, 2000.

GAY, R.; SWIDEREK, M.; NELSON, D.; ERNESTI, A. The Living Skin Equivalent as a Model Invitro for Ranking the Toxic Potential of Dermal Irritants. **Toxicology in Vitro**, v. 6, n. 4, p. 303-315, 1992.

GAZORI, T.; KHOSHAYAND, M.; AZIZI, I.; YAZDIZADE, P.; NOMANI, A.; HARIRIAN, I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 599-606, 2009.

GEOFF, G. Z.; Z., Z.; ZHOU, D. Crystalline and Amorphous Solids. In: (Ed.). **Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and Practice**. United States of America: Elsevier Inc, 2009, p.25-60. .

GOHY, J. F. Block Copolymer Micelles. **Advances in Polymer Science**, v. 190, n., p. 65-136, 2005.

GRANADA, A.; MURAKAMI, F. S.; SARTORI, T.; LEMOS-SENNA, E.; SILVA, M. A. Development and validation of an HPLC method to quantify camptothecin in polymeric nanocapsule suspensions. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 3, p. 551-556, 2008.

GRANADA, A.; TAGLIARI, M. P.; SOLDI, V.; SILVA, M. A.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; FERNANDES, D.; STULZER, H. K. Nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: validation of a stability-indicating HPLC method to evaluate the drug entrapment efficiency and in vitro release profiles. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 2, p. 276-281, 2013.

GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. New form discovery for the analgesics flurbiprofen and sulindac facilitated by polymer-induced heteronucleation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 11, p. 2978-2986, 2007.

GUNGOR, N.; ALEMDAR, A.; ATICI, A.; ECE, O. The effect of SDS surfactant on the flow and zeta potential of bentonite suspensions. **Materials Letters**, v. 51, n. 3, p. 250-254, 2001.

GUO, Y. L.; CUI, Z. S.; HAN, M. Synthesis, Micellization and Characterization of Novel Amphiphilic beta-Cyclodextrin/Poly(L-aspartate) Copolymer. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 29, n. 3, p. 603-606, 2013.

GUO, Z.; JIN, Y.; LIANG, T.; LIU, Y.; XU, Q.; LIANG, X.; LEI, A. Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a "Click beta-cyclodextrin" stationary phase. **J Chromatogr A**, v. 1216, n. 2, p. 257-263, 2009.

GUPTA, U.; AGASHE, H. B.; ASTHANA, A.; JAIN, N. K. A review of in vitro-in vivo investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers. **Nanomedicine**, v. 2, n. 2, p. 66-73, 2006.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, n., p. 147-157, 2007.

HAMLEY, I. W. Nanostructure fabrication using block copolymers. **Nanotechnology**, v. 14, n. 10, p. R39-R54, 2003.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. Exploring QSAR, Hydrophobic, Electronic and Steric constants. In: (Ed.). **American Chemical Society**. Washington, DC. USA, , 1995,

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, 2006. 1047-1050 p.

HASANOVIC, A.; HOLLICK, C.; FISCHINGER, K.; VALENTA, C. Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 148-153, 2010.

HE, Y.; FU, P.; SHEN, X.; GAO, H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. **Micron**, v. 39, n. 5, p. 495-516, 2008.

HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; HADGRAFT, J.; GUY, R. H. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1850-1856, 2006.

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 125-141, 1999.

HOELLER, S. S., A.; VALENTA, C. . Lecithin based nanoemulsions: a comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n., p., 2009.

HUANG, L. F.; TONG, W. Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 321-334, 2004.

ISONO, T.; OTSUKA, I.; SUEMASA, D.; ROCHAS, C.; SATOH, T.; BORSALI, R.; KAKUCHI, T. Synthesis, Self-Assembly, and Thermal Caramelization of Maltoheptaose-Conjugated Polycaprolactones Leading to Spherical, Cylindrical, and Lamellar Morphologies. **Macromolecules**, v. 46, n. 22, p. 8932-8940, 2013.

JONES, M.; LEROUX, J. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, n. 2, p. 101-111, 1999.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 113-131, 2001.

KORTING, H. C.; SCHAFER-KORTING, M. Carriers in the topical treatment of skin disease. **Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology**, v., n. 197, p. 435-468, 2010.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KWON, G. S.; OKANO, T. Polymeric micelles as new drug carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21 n. 2, p. 107-116, 1996.

LANCASTER, R. W.; KARAMERTZANIS, P. G.; HULME, A. T.; TOCHER, D. A.; LEWIS, T. C.; PRICE, S. L. The polymorphism of progesterone: stabilization of a 'disappearing' polymorph by co-crystallization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 12, p. 3419-3431, 2007.

LANCASTER, R. W.; HARRIS, L. D.; PEARSON, D. Fifty-year old samples of progesterone demonstrate the complex role of synthetic impurities in stabilizing a metastable polymorph. **Crystengcomm**, v. 13, n. 6, p. 1775-1777, 2011.

LANG, M. D.; KAMPF, J. W.; MATZGER, A. J. Form IV of carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p. 1186-1190, 2002.

LEE, J. S.; FEIJEN, J. Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization. **Journal Control Release**, v. 161, n. 2, p. 473-483, 2012.

LEMARCHAND, C.; GREFF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 327-341, 2004.

LEMOSENENA, E.; WOUESSIDJEWE, D.; DUCHÊNE, D. Release profiles of a hydrophobic drug incorporated in modified cyclodextrin nanospheres. In: International Symposium on Cyclodextrins, 1996, Budapest:Kluwer Academic Publishers, p. 431-434.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate

structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 259-269, 2007.

LI, B. G.; ZHANG, L. M. Synthesis and characterization of novel amphiphilic block copolymers based on maltoheptaose. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 390-395, 2008.

LI, H.; KOCHHAR, J. S.; PAN, J.; CHAN, S. Y.; KANG, L. Nano/microscale technologies for drug delivery. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 11, n. 2, p. 337-367, 2011.

LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Amphiphilic molecules: small and large. In: Lindman, P. A. A. B. (Ed.). **Amphiphilic Block Copolymers**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000, p.1-12.

LINSE, P. Modelling of the self-assembly of block copolymers in selective solvent In: (Ed.). **Amphiphilic Block Copolymers**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000, p.13-40.

LIU, T. B.; ZHOU, Z. K.; WU, C. H.; NACE, V. M.; CHU, B. Effects of block lengths on the association numbers and micellar sizes of BnEmBn type triblock copolymer micelles in aqueous solution. **Macromolecules**, v. 30, n. 24, p. 7624-7626, 1997.

LOPEZ-MEJIAS, V.; KAMPF, J. W.; MATZGER, A. J. Polymer-Induced Heteronucleation of Tolfenamic Acid: Structural Investigation of a Pentamorph. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 13, p. 4554-+, 2009.

LOUKAS, Y.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Drugs in cyclodextrins in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1, p. 137-142, 1998.

LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K. H.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 4, p. 190-197, 2006.

LV, H. X.; ZHANG, Z. H.; WANG, X. P.; CHENG, Q. Q.; WANG, W.; HUANG, X. H.; ZHOU, J. P.; ZHANG, Q.; HOU, L. L.; HUO, W. A biomimetic chitosan derivatives: preparation, characterization and transdermal enhancement studies of N-arginine chitosan. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6778-6790, 2011.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n., p. 221-241, 1991.

MAHMOUD, A. A.; EL-FEKY, G. S.; KAMEL, R.; AWAD, G. E. Chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 229-236, 2011.

MASHRU, R.; SUTARIYA, V.; SANKALIA, M.; SANKALIA, J. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 54-62, 2005.

MAZZARINO, L.; OTSUKA, I.; HALILA, S.; BUBNIAK, L. D.; MAZZUCCO, S.; SANTOS-SILVA, M. C.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R. Xyloglucan-block-Poly(epsilon-Caprolactone) Copolymer Nanoparticles Coated with Chitosan as Biocompatible Mucoadhesive Drug Delivery System. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 5, p. 709-719, 2014.

MAZZARINO, L. O., I.; HALILA, S.; BUBNIAK LDOS, S.; MAZZUCCO, S.; SANTOS-SILVA, MC.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R. Xyloglucan-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer nanoparticles coated with chitosan as biocompatible mucoadhesive drug delivery system. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 5, p., 2014.

MCCORMACK, B.; GREGORIADIS, G. Drugs in cyclodextrins in liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1, p. 59-69, 1998.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. S3-S17, 2002.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 5, p. 875-910, 2012.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 18, n. 6, p. 527-550, 2001.

MUHAMMAD, F.; RIVIERE, J. E. In vivo models. In: Riviere, J. E. E. (Ed.). **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York:, 2006,

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p., 2004.

MUNSTER, U.; NAKAMURA, C.; HABERLAND, A.; JORES, K.; MEHNERT, W.; RUMMEL, S.; SCHALLER, M.; KORTING, H. C.; ZOUBOULIS, C. C.; BLUME-PEYTAVI, U.; SCHAFER-KORTING, M. RU 58841-myristate - prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia. **Pharmazie**, v. 60, n. 1, p. 8-12, 2005.

MYERS, D. **Surfactant Science and Technology** secondary title. New Yor, 1992.

NAFEE, N.; TAETZ, S.; SCHNEIDER, M.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. **Nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 173-183, 2007.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NAKAI, Y.; YAMAMOTO, K.; TERADA, K.; UENO, Y. Effects of the degree of polymerization of oligosaccharides on the properties of

ground mixtures. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 315-319, 1986.

NORONHA, C. N.; GRANADA, A. F.; CARVALHO, S. M.; LINO, R. C.; MACIEL, V. O. B.; BARRETO, P. L. M. Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops & Products**, v. 50, n., p. 896-903, 2013.

O'REILLY, R. K. Spherical polymer micelles: nanosized reaction vessels? **Philos Trans A Math Phys Eng Sci**, v. 365, n. 1861, p. 2863-2878, 2007.

OTSUKA, I.; FUCHISE, K.; HALILA, S.; FORT, S.; AISSOU, K.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; CHEN, Y.; NARUMI, A.; KAKUCHI, T.; BORSALI, R. Thermoresponsive vesicular morphologies obtained by self-assemblies of hybrid oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer systems. . **Langmuir**, v. 26, n. 4, p. 2325-2332, 2010.

OTSUKA, I.; ISONO, T.; ROCHAS, C.; HALILA, S.; FORT, S.; SATOH, T.; KAKUCHI, T.; BORSALI, R. 10 nm Scale Cylinder-Cubic Phase Transition Induced by Caramelization in Sugar-Based Block Copolymers. **ACS Macro Letters**, v. 1, n. 12, p. 1379-1382, 2012a.

OTSUKA, I.; TRAVELET, C.; HALILA, S.; FORT, S.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; NARUMI, A.; BORSALI, R. Thermoresponsive self-assemblies of cyclic and branched oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) diblock copolymers into nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 5, p. 1458-1465, 2012b.

OTSUKA, I.; OSAKA, M.; SAKAI, Y.; TRAVELET, C.; PUTAUX, J. L.; BORSALI, R. Self-assembly of maltoheptaose-block-polystyrene into micellar nanoparticles and encapsulation of gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 29, n. 49, p. 15224-15230, 2013a.

OTSUKA, I.; TALLEGAS, S.; SAKAI, Y.; ROCHAS, C.; HALILA, S.; FORT, S.; BSIESY, A.; BARON, T.; BORSALI, R. Control of 10 nm scale cylinder orientation in self-organized sugar-based block copolymer thin films. **Nanoscale**, v. 5, n. 7, p. 2637-2641, 2013b.

PATZELT, A.; ANTONIOU, C.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Skin penetration from the inside to the outside: a review. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 2, p. e229-e235, 2008a.

PATZELT, A.; ANTONIOU, C.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Skin penetration from the inside to the outside: a review. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 2, p. 229-235, 2008b.

POLETTTO, F. S.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. In: Beck, R. G., S. S.; Pohlmann, A. (Eds.) (Ed.). **New approaches for skin care. Nanocosmetics and Nanomedicines**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg., 2011, p.380.

PONEC, M. Reconstruction of Human Epidermis on De-Epidermized Dermis - Expression of Differentiation-Specific Protein Markers and Lipid-Composition. **Toxicology in Vitro**, v. 5, n. 5-6, p. 597-606, 1991.

PORTO, L. C. **Estudo de filmes finos e de nanopartículas obtidos pela auto-associação de copolímeros em bloco e sua interação com um oligo/polissacarídeo**. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2011. 171 p.

PRICE, C. P.; GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. Crystalline polymorph selection and discovery with polymer heteronuclei. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 15, p. 5512-5517, 2005.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; ROBERTSON, T. A.; ROBERTS, M. S.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; SOYER, H. P. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

QUAGLIA, F.; OSTACOLO, L.; NESE, G.; CANCELLLO, M.; DE ROSA, G.; UNGARO, F.; PALUMBO, R.; LA ROTONDA, M. I.; MAGLIO, G. Micelles based on amphiphilic PCL-PEO triblock and star-shaped diblock copolymers: Potential in drug delivery applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 87A, n. 3, p. 563-574, 2008.

RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ, J.; CHÉCOT, F.; GNANOU, Y.; LECOMMANDOUX, S. Towards "smart" nano-objects by self assembly of block copolymers in solution. **Progress in Polymer Science**, v. 30, n. 7, p. 691-724, 2005.

RODRIGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C. P.; JAYASANKAR, A.; MATZGER, A. J.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 241-274, 2004.

ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 41, n. 14, p. 2596-2599, 2002.

ROUX, M.; PERLY, B.; DJEDAINI-PILARD, F. Self-assemblies of amphiphilic cyclodextrins. **European Biophysics Journal**, v. 36, n. 8, p. 861-867, 2007.

RUGHANI, R. V.; SCHNEIDER, J. P. Molecular Design of beta-Hairpin Peptides for Material Construction. **MRS Bull**, v. 33, n. 5, p. 530-535, 2008.

RUOZI, B.; TOSI, G.; LEO, E.; VANDELLI, M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. **Talanta**, v. 73, n. 1, p. 12-12, 2007.

SAENGER, W. R.; JACOB, J.; GESSLER, K.; STEINER, T.; HOFFMANN, D.; SANBE, H.; KOIZUMI, K.; SMITH, S. M.; TAKAHA, T. Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues - Beyond the doughnut. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1787-1802, 1998.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2001.

SANGSTER, J. **Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry**. Wiley, New York, 1997

SANTANDER-ORTEGA, M. J.; LOZANO-LOPEZ, M. V.; BASTOS-GONZALEZ, D.; PEULA-GARCIA, J. M.; ORTEGA-VINUESA, J. L. Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces. **Colloid and Polymer Science**, v. 288, n. 2, p. 159-172, 2010.

SATO, M. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. R. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SAULNIER, P.; ANTON, N.; HEURTAULT, B.; BENOIT, J. P. Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, n. 3, p. 221-228, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHÄRTL, W. **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**. Springer Laboratory Manuals in Polymer Science 2007

SHEN, Z.; LI, Y.; KOHAMA, K.; ONEILL, B.; BI, J. Improved drug targeting of cancer cells by utilizing actively targetable folic acid-conjugated albumin nanospheres. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 1, p. 51-58, 2011.

SHIM, J.; SEOK KANG, H.; PARK, W. S.; HAN, S. H.; KIM, J.; CHANG, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **J Control Release**, v. 97, n. 3, p. 477-484, 2004.

SMART, T.; LOMAS, H.; MASSIGNANI, M.; FLORES-MERINO, M. V.; PEREZ, L. R.; BATTAGLIA, G. Block copolymer nanostructures. **Nanotoday**, v. 3, n. 3-4, p. 38-36, 2008.

SMITH, J.; WOOD, E.; DORNISH, M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2004.

SOO, P. L.; EISENBERG, A. Preparation of Block Copolymer Vesicles in Solution **Journal of Polymer Science. Part B**, v. 42, n. 6, p. 923-938, 2004.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

SUHONEN, T. M.; BOWSTRA, J. A.; URTIL, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alternations. . **Journal of Controlled Release**, v. 59, n. 2, p. 149-161, 1999.

TAKUYA, I.; OTSUKA, I.; KONDO, Y.; HALILA, S.; FORT, S.; ROCHAS, C.; SATOH, T.; BORSALI, R.; KAKUCHI, T. Sub-10 nm Nano-Organization in AB2 and AB3 Type Miktoarm Star Copolymers Consisting of Maltoheptaose and Polycaprolactone. **Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 1461-1469, 2013.

TORNOE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 3057-3064, 2002.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug fomulation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 900-915, 2004.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug fomulation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n., p., 2004.

UTSUKI, T.; BREM, H.; PITHA, J.; LOFTSSON, T.; KRISTMUNDSDOTTIR, T.; TYLER, M.; OLIVI, A. Potentiation of anticancer effects of microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl-

α -cyclodextrin. **Journal of Controlled Release**, v. 40, n. 3, p. 251-260, 1996.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1-2, p. 141-151, 2003.

VIGO, F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, H. V. E. Progestógenos: farmacologia e uso clínico. **Femina**, v. 39, n. 3, p. 126-137, 2011.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITAIN, H. G.; GRANT, D. J. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.

WANG, F. W., J. A.; ANTOSZ, F. J.; BERGLUND, K. A. . An investigation of solvent-mediated polymorphic transformation of progesterone using in situ Raman spectroscopy. **Organic Process Research & Development**, v. 4, n. 5, p., 2000.

WANG, J. J.; LIU, K. S.; SUNG, K. C.; TSAI, C. Y.; FANG, J. Y. Skin permeation of buprenorphine and its ester prodrugs from lipid nanoparticles: lipid emulsion, nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 8, p. 734-747, 2009.

WEBBER, S. E. Polymer micelles: An example of self-assembling polymers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 15, p. 2618-2626, 1998.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YADAV, S. C.; KUMARI, A.; YADAV, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 173-187, 2011.

YU, K.; ZHANG, L.; EISENBERG, A. Novel morphologies of "crew-cut" aggregates of amphiphilic diblock copolymers in dilute solution. **Langmuir**, v. 12, n. 25, p. 5980-5984, 1996.

ZALANYI, S. Progesterone and ovulation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 98, n. 2, p. 152-159, 2001.

ZAMBONI, W. C. Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 23, p. 8230-8234, 2005.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; LEMOS-SENNA, E.; CRAMAIL, H.; CLOUTET, E.; BORSALI, R.; SOLDI, V. The role of surfactant in the miniemulsion polymerization of biodegradable polyurethane nanoparticles. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 28, n. 4, p. 526-531, 2008.

ZHAI, X.; LADEMANN, J.; KECK, C. M.; MULLER, R. H. Dermal nanocrystals from medium soluble actives - physical stability and stability affecting parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 85-91, 2014.

ZHANG, J.; MA, P. X. Core-shell structured nanoassemblies based on beta-cyclodextrin containing block copolymer and poly(beta-benzyl L-aspartate) via host-guest complexation. **Polymer**, v. 52, n. 21, p. 4928-4937, 2011.

ZHANG, L.; SHEN, H.; EISENBERG, A. Phase Separation Behavior and Crew-Cut Micelle Formation of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Copolymers in Solutions. **Macromolecules**, v. 30, n. 4, p. 1001-1011, 1997.

ZHAO, Y.; LIANG, H. J.; WANG, S. G.; WU, C. Self-assembly of poly(caprolactone-b-ethylene oxide-b-caprolactone) via a microphase inversion in water. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 4, p. 848-851, 2001.